
NMR-Spektroskopische Strukturaufklärung eines neuen antituberkulotisch wirksamen Depsipeptids und weiterer kleiner Moleküle

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. (FH) Maic Fredersdorf

aus Erbach/Odenwald

Referent: Prof. Dr. Christina M. Thiele

Korreferent: Prof. Dr. Michael Reggelin

Tag der Einreichung: 01. März 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 25. April 2016

Darmstadt 2016

D17



Inhaltsverzeichnis

Danksagung	v
Abbildungsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1..... Einleitung	1
2..... Aufgabenstellung	4
3..... Theoretische Grundlagen	6
3.1. Strukturaufklärung kleiner Moleküle und Peptide mittels klassischer NMR-Experimente und Methoden	6
3.2. Residuale Dipolare Kopplungen (RDCs) in der Strukturanalyse	13
3.2.1. Theoretische Aspekte	13
3.2.2. Erzeugung von 3D-Strukturvorschlägen	21
3.2.3. Alignment Medien	25
3.2.4. NMR-Experimente und Methoden zur Ermittlung der RDCs	29
3.3. Praktische Aspekte der RDC- und NOE/ ROE-Analyse in der Strukturanalytik von kleinen Molekülen und Peptiden	32
3.3.1. Strukturanalysen von Peptiden mit Torsionswinkel-, NOE- und RDC-Daten	32
3.3.2. Untersuchung von Naturstoffen mit RDCs und Behandlung von Mindermengen	40
4..... Ergebnisteil der Dissertation	46
4.1. Griselimycine	46
4.1.1. Herkunft, Funktion und Zielsetzungen	46
4.1.2. Methoden, Konformationsanalysen und verschiedene Strukturmodelle von MGM	47
4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen	68
4.2. Diacetylhygrophorone A ¹²	71
4.3. Dithienylcyclopentenes	81
5..... Zusammenfassung	97
6..... Ergänzende Daten	99
6.1. Messdaten und Parameter aus dem Methylgriselimycinprojekt	99
6.2. Verweis auf die Daten und Methoden aus dem Hygrophoron-Projekt	149
6.3. Verweis auf die Daten und Methoden aus dem Dithienylcyclopenten-Projekt	150
7..... Literatur	151





Und plötzlich weißt du:

*Es ist Zeit, etwas Neues zu beginnen
und dem Zauber des Anfangs zu vertrauen.*

Meister Eckhart (1260-1327)



Danksagung

Zum Beginn dieser Arbeit möchte ich mich vorab bei all denjenigen bedanken, die mir in den letzten Jahren die Treue gehalten und dadurch auch wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Anfangen möchte ich bei meiner Familie Heide und Bernd Fredersdorf, Annemarie Fredersdorf, Nicole Kleine, Michael Kleine, Greta Kleine, Giovanni Leandro, Roland und Inge Thierolf und allen Verwandten die immer an mich geglaubt und meine Marotten, vor allem während der heißen Phase in der Promotionszeit, tapfer ertragen haben.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Martin Will, Dr. Werngard Czechtizky und Dr. Stefan Balbach. Ohne deren Zustimmung wäre diese Arbeit sicherlich nicht möglich gewesen. Insbesondere möchte ich mich aber auch bei meinen Kollegen Dr. Michael Kurz, Dr. Günter Schneider und Dr. Peter Monecke für die hilfreichen Gespräche und wertvollen Tipps während dieser Zeit bedanken. Ein gebührender Dank gilt auch meinem Team Sandra Franz, Nicole Hörl, Ulrike Heinemann und Christine Heger die mich bei meiner täglichen Arbeit tatkräftig unterstützten und mir somit die für die Promotion notwendigen Freiräume geschaffen haben. Zusätzlich möchte ich mich auch bei meinen (Ex)-Kollegen Karin Löber, Klaus Schmalz-Stahl, Rita Gernand-Örtl, Mario Jung, Michael Weber und Ute Messinger für die routinemäßig durchgeführten freitäglichen Rindswurst-Sessions und die insgesamt sehr schöne Zeit in der Analytik bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Michael Reggelin für den „ersten Kontakt“ zum Fachbereich Chemie der TUD und für die Zulassung zum Promotionsstudium. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christina M. Thiele die mich ohne Vorbehalte in ihren Arbeitskreis aufgenommen hat und zu 100% integrierte. Dabei werden mir vor allem die sportlichen Seminare im Kleinwalsertal und die schönen Weihnachtsfeiern in Erinnerung bleiben.

Zu einem guten Arbeitskreis gehören auch gute Kollegen von denen ich einigen zu besonderem Dank verpflichtet bin. Ich danke Dr. Volker Schmidts der mich in die Thematik der RDCs und des „Rotwein-trinkens“ einführte und mir während der gesamten Zeit stets mit Rat zur Seite stand.

Ich danke Dr. Tobias Montag für die Einführung in die hohe Kunst des Kaffeekochens und Dr. Yulia Moskalenko für die interessanten Info's über Schnecken und die tollen Gespräche bei den Wanderungen im Kleinwalsertal. Zusätzlich möchte ich mich noch bei den beiden aber auch bei Dr. Nils-Christopher Meyer für die Spende der Alignment-Medien bedanken.

Des Weiteren bin ich auch Dr. Andreas Kolmer für die Einführung in die präzise NOE-Distanzmessung zu Dank verpflichtet. Auch bei dem restlichen Arbeitskreis nämlich Michaela Fröhlich, Stefanie Hansmann, Lukas Kaltschnee, Jonas Kind, Mira Köberle, Martin Leyendecker, Susann Weißheit, Michaela Standhardt, Dr. Christiane Wolff, Sharon Jeziorowski und Dr. Witali Blum möchte ich mich herzlich für die schöne Zeit und eure Unterstützung bedanken.

Neben der Familie, dem Beruf und dem Arbeitskreis sind echte Freunde vor allem in schwierigen Zeiten besonders wichtig. Daher möchte ich mich hier bei meinen Freunden Sebastian Sparn, Dr. Timo Wulfmeyer, Sebastian Hieke, den „Damstädter-Jungs“ und der „Sausalitos-Truppe“ für die abwechslungsreiche Freizeitgestaltung neben dem Studium und Beruf bedanken. Eure motivierende Art und gute Laune haben mir über so manches Tief hinweg geholfen. DANKE!



Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Methylgriselimycin aus der Familie der Griselimycine. Methylgriselimycin unterscheidet sich vom Griselimycin durch die Anwesenheit von *L*-(R)-4-methylprolin anstatt *L*-Prolin an Position 8 der Aminosäuresequenz. 4
- Abbildung 2: 4,6-Diacetylhygrophorone A^{12} aus der Gruppe der Hygrophorone mit zwei endozyklischen und einem exozyklischen Stereozentrum. Die Relativkonfiguration am exozyklischen Stereozentrum ist unbekannt. 5
- Abbildung 3: Offene Form von Dimethyldithienylcyclopenten. Die beiden Methylgruppen an der Cyclopenten-Einheit sind *trans*-konfiguriert. Gezeigt ist hier eine antiparallele Konformation, welche nach Bestrahlung mit UV-Licht zum Ringschluss führt. 5
- Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aminosäure Valin in einem 2D-COSY-Spektrum (linke Abbildung) und einem 2D-TOCSY-Spektrum (rechte Abbildung). Das komplette Spinsystem von Valin ist im TOCSY erkennbar. Die unterhalb der Diagonalen liegenden Signale des TOCSY-Spektrums wurden der Übersicht wegen weggelassen. 6
- Abbildung 5: Links: Beispiel zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Kopplungskonstante $^3J_{HN-H\alpha}$ und dem Torsionswinkel zwischen CO_i und CO_{i-1} (rechte Abbildung) an einem Peptid. Für eine gemessene Kopplungskonstante existieren zwischen zwei und vier Torsionswinkel. Rechts: Newman-Projektion entlang der $C\alpha$ -N-Achse. Der Index i bezeichnet die Stellung der Aminosäure in der Sequenz. (Schema nach Lottspeich)³⁶ 8
- Abbildung 6: Energiediagramm für ein Zweispinsystem (Kernspin $\frac{1}{2}$), nach Neuhaus.¹² Gezeigt werden die Spinzustände und deren Übergänge. 9
- Abbildung 7: Abhängigkeit der maximalen NOE-Verstärkung (roter Kurvenverlauf) von der Korrelationszeit $\omega\tau_C$ in logarithmischer Auftragung. Bei $\omega\tau_C \approx 1.12$ ist die NOE-Verstärkung Null, hier wird meist das ROESY-Experiment verwendet, da der ROE immer positiv ist (grüner Kurvenverlauf). 10
- Abbildung 8: Häufig verwendete Kalibrierungsabstände bei der semi-quantitativen NOE-Bestimmung. 11
- Abbildung 9 : Zweidimensionale Vektordarstellung des Winkels θ_{IS} zwischen dem Magnetfeld B_0 und den beiden Kernspins I und S , wobei e_{IS} dem Einheitsvektor entspricht. Für eine einzelne dipolare Kopplung D_{IS} kann der Kernspinvektor sowohl in die Richtung (+z) des oberen als auch in die Richtung des unteren Kegels (-z) zeigen. In der x und y Ebene kann der Kernspinvektor jegliche Orientierung annehmen, dies wird durch die beiden Kegel gezeigt. Eine einzelne dipolare Kopplung kodiert also ein Kontinuum an Orientierungen. 14
- Abbildung 10: Transformation vom Laborkoordinatensystem in dem das Molekül rotiert ($\theta(t)$) in ein molekülfestes Koordinatensystem ($B_0(t)$). Die Winkel α_x , α_y und α_z sind nun fixiert und durch die Molekülgeometrie vorgegeben. Die Winkel β_x , β_y und β_z zum Magnetfeld sind nun variabel und zeitlich gemittelt. 15
- Abbildung 11: Schematische Darstellung der SCST-Methode. Mit der Bereitstellung eines Strukturmodells (hier als Beispiel Artemisinin) und den experimentellen RDCs wird mit Hilfe der SVD der Alignment-Tensor berechnet. Die aus dem Tensor rückberechneten RDCs können dann in einem Korrelationsdiagramm mit den experimentellen RDCs verglichen werden. Zusammen

mit den berechneten Qualitätsfaktoren ergibt sich dann meist ein eindeutiges Bild, ob der Strukturvorschlag zu den ermittelten experimentellen Daten passt.....	18
Abbildung 12: Schematische Darstellung der RDC-Auswertung in flexiblen Molekülen (hier im Beispiel: 2 Konformere, rot und grün) nach der MCST-Methode. Die Koordinaten der verschiedenen Konformeren werden durch die ECKART-Transformation in ein gemeinsames Koordinatensystem überführt. Die Anpassung der experimentellen RDCs wird durch eine Permutierung der Konformerpopulation (p_1 , p_2) durchgeführt. Das Konformerensemble mit den besten Übereinstimmungen (siehe grünes Kurvenminimum im Diagramm, $p_2 = 1 - p_1$) bezüglich Qualitätsfaktoren wird als das korrekte angenommen.	20
Abbildung 13: Darstellung der wichtigsten Einzelkomponenten die bei der Kraftfeldanalyse berücksichtigt werden. Aus der Summe der Einzelenergien ergibt sich die Gesamtenergie der untersuchten Struktur.....	21
Abbildung 14: Potentielle Energie eines Moleküls (Ordinate) als Funktion seiner Konformation (Abszisse). Linke Abbildung: Aus der Startkonformation wird durch Anwendung von stochastischen bzw. Monte-Carlo-Verfahren-Verfahren und anschließender Energieminimierung die Zielstruktur erzeugt. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, wobei die erzeugte Zielstruktur als Startstruktur im nachfolgenden Suchlauf dient. Rechte Abbildung: Die Molekulardynamik-Verfahren tasten den Konformationsraum auf der Potentialhyperfläche über einen gewissen Zeitraum selbstständig ab (üblicherweise im ps- oder ns-Bereich) und liefern somit die entsprechenden Konformationsverteilungen über den abgetasteten Zeitraum (Häufigkeitsverteilung). ⁸⁴	22
Abbildung 15: Gegenüberstellung einer flüssigkristallinen Phase und eines quervernetzten Polymergels mit Analyt. Links: Die flüssigkristalline Phase überträgt ihre Ordnung auf den Analyten, sodass er eine Vorzugsausrichtung zum Magnetfeld B_0 einnimmt. Rechts: Lässt man das Polymergel in einem NMR-Röhrchen quellen so bildet sich eine anisotrope Umgebung aus, sobald der Geldurchmesser größer als der NMR-Röhrchen-Durchmesser ist. Die Anisotropie lässt sich verstärken, wenn das Polymergel zusätzlich gestaucht wird und sich dadurch die Hohlräume, in die die Analyten eindiffundieren, verkleinern. ^{113,114,115} Die somit größere Anisotropie lässt sich qualitativ an einer größeren Quadrupolaufspaltung ν_Q ablesen, siehe auch im weiterführenden Text.....	25
Abbildung 16: Positionsfernordnungen von flüssigkristallinen Phasen. Die smektische Phase A (SmA) hat im Vergleich zu B (SmC) keinen Winkel Θ zwischen dem Direktor und der Schichtnormalen. Die cholesterische Phase weist eine nematische Ordnung mit sich kontinuierlich drehender Vorzugsorientierung auf.	26
Abbildung 17: 2D-Imaging-Abbildung Polymerstick. Deutlich ist die unerwünschte Änderung der Quadrupolaufspaltung über die z-Achse des aktiven Volumens zu erkennen.....	28
Abbildung 18: Jeweils vier Atome definieren die Torsionswinkel ϕ , ψ und ω . Der Index i bezeichnet die entsprechende Aminosäure, $i-1$ und $i+1$ jeweils die vorangegangene bzw. nachfolgende Aminosäure.....	32
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Resonanzstruktur einer <i>trans</i> -Peptidbindung (partieller Doppelbindungscharakter) und der Torsionswinkel (Diederwinkel) ϕ , ψ und ω	32
Abbildung 20: Schematische Darstellung eines Ramachandran-Plots. Aus den Schnittmengen der entsprechenden Winkelkombinationen ϕ und ψ kann die Sekundärstruktur (blaue Umrandungen)	

des Peptids oder auch Proteins ermittelt werden. Die in Klammern gesetzten Buchstaben (<i>L</i>) bzw. (<i>R</i>) beschreiben linksgängige (selten) und rechtsgängige Helix (häufig).	33
Abbildung 21: Cyclosporin A (CsA) ist ein zyklisches Peptid, das aus elf zum Teil modifizierten Aminosäuren besteht.	34
Abbildung 22: Cyclosporin A : Überlagerung der Röntgenstruktur (rot), NOE-Struktur (grün) und RDC-Struktur (blau) im gut definierten β -turn (Abu-2, Sar-3, MeLeu-4 und Val-5). ¹⁶⁹ Die Abbildung wurde aus J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, <i>ChemBioChem</i> 2005 , 6, 1672-1678, DOI 10.1002/cbic.200500146 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.	35
Abbildung 23: Das zyklische Depsipeptid Hormaomycin besteht aus sieben Aminosäuren. Bis auf die Aminosäure (S)-Isoleucin sind alle anderen nicht-proteinogen.	36
Abbildung 24: Hormaomycin : Darstellung der beiden Hauptkonformere (NJ _a und NJ _b) des NOE-/ J-Kopplungsensembles in DMSO. Sie zeigen vor allem größere Unterschiede im (β -Me)Phe 2 ψ Torsionswinkel. ¹⁷² Die Abbildung wurde aus U. M. Reinscheid, J. Farjon, M. Radzom, P. Haberz, A. Zeeck, M. Blackledge, C. Griesinger, <i>ChemBioChem</i> 2006 , 7, 287-296, DOI 10.1002/cbic.200500277 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.	37
Abbildung 25: Struktur von Cyclolinopeptid A . Alle Aminosäuren sind <i>L</i> -konfiguriert.	38
Abbildung 26: Cyclolinopeptid A : Überlagerung der mit RDC-Werten verfeinerten Struktur (grün) mit der NOE-abgeleiteten Struktur (blau). ¹⁷³ Die Abbildung wurde aus K. Huben, M. Jewgiński, A. Pabis, P. Paluch, B. Luy, S. Jankowski, <i>J. Pept. Sci.</i> 2014 , 20, 901-907, DOI 10.1002/psc.2683 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.	39
Abbildung 27: Vatiparol mit acht stereogenen Zentren, gezeigt in der Absolutkonfiguration <i>SRSSRSSR</i> . Die Konstitution des Kohlenstoffgerüsts ebenso wie dessen Konfiguration wurde hier erstmals beschrieben. ¹⁷⁵ Die Abbildung wurde aus H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, <i>Chem. Eur. J.</i> 2012 , 18, 5213–5221, DOI 10.1002/chem.201104078 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.	40
Abbildung 28: Vergleich zwischen einem 5 mm und 1.7 mm NMR- Röhrchen mit den entsprechenden Alignment Gelen. ¹⁷⁵ Die Abbildung wurde aus H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, <i>Chem. Eur. J.</i> 2012 , 18, 5213–5221, DOI 10.1002/chem.201104078 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.	41
Abbildung 29: Chemische Struktur von Griselimycin (<i>L</i> -N-Methylvalin (acetyliert) (1), <i>L</i> -(<i>R</i>)-4-Methylprolin (2), <i>L</i> -N-Methylthreonin (3), <i>L</i> -Leucin (4), <i>L</i> -(<i>R</i>)-4-Methylprolin (5), <i>L</i> -Leucin (6), <i>L</i> -N-Methylvalin (7), <i>L</i> -Prolin (8), <i>D</i> -N-Methyl- <i>D</i> -Leucin (9), Glycin (10)) und Derivaten. Die Substitution des Protons an der Position 4 (γ) von Prolin 8 durch eine Methyl- oder Cyclohexylgruppe erhöht die metabolische Stabilität im Vergleich zu Griselimycin erheblich. ²⁷	46
Abbildung 30: Konformerensemble von MGM bestehend aus 10 Strukturen. Der RMSD [Å] zwischen den Atomen der überlagerten Konformeren über alle Schweratome liegt bei 0.64 Å \pm 0.22 Å. Die Distanzen der postulierten Wasserstoffbrückenbindung sind in violett in die Abbildung eingetragen.	47
Abbildung 31: Quadrupolaufspaltung (16 Hz) des Lösungsmittelsignals im PDMS-Gel mit 6 mg MGM aufgenommen bei T= 300K.	48

Abbildung 32: Überlagerung des isotropen (blau) mit dem anisotropen (rot) Protonenspektrum. Im isotropen und anisotropen Spektrum ist ein doppelter Signalsatz erkennbar.	49
Abbildung 33: Überlagerung der 165 generierten MGM-Strukturen anhand des zyklischen Teils des Peptidrückgrats (<i>conformational</i> -search, Maestro-Schrödinger). Die Seitenkette (acetyliertes-MeVal1 und MePro2) wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt.	52
Abbildung 34: Strukturüberlagerung von RUN317 des zyklischen Teils des Peptids anhand der Schweratome des Rückgrats. Die flexible Seitenkette wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Die berechneten 96 Strukturen (A) sind eher gruppiert und weisen Cluster auf. Auf der rechten Abbildung (B) sind die 20 überlagerten Strukturen mit den niedrigsten Energien angezeigt. Auch hier liegt die Vermutung eines „overrestraining“ durch die Verwendung der 146 ROE-Kontakte vor.	55
Abbildung 35: Energieterme und Gesamtenergie der 96 berechneten Strukturen (RUN317), welche mit allen ermittelten ROE-restraints berechnet wurden. In der Farbe Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Rot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.	56
Abbildung 36: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (RUN420a). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Bei der Berechnung mit XPLOR-NIH wurden 40 ROEs verwendet. Im Vergleich zu den Strukturen welche mit 146 ROE-Kontakten bestimmt wurden sind diese hier nicht in einzelne Cluster gruppiert sondern weisen eher ein Kontinuum auf (A). In Abbildung B sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.	57
Abbildung 37: Energien der aus RUN420a berechneten Strukturen. In der Farbe Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Rot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.	57
Abbildung 38: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (RUN320). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Bei der Berechnung wurden alle ROE- und 16 RDC-restraints verwendet. Die Strukturen bilden auch hier keinen kontinuierlichen Übergang. In Abbildung B sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.	58
Abbildung 39: Energien der im RUN320 generierten Strukturen, welche mit allen ROE- und 16 RDC-restraints erzeugt wurden. In der Farbe Rot ist der Tensor-, in Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Dunkelrot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.	59
Abbildung 40: Berechnete RMSD-Werte ($D_{exp} \rightarrow D_{calc}$) aus RUN320 . Die Werte liegen zwischen $RMSD_{(min)} = 0.18$ Hz und $RDC_{(max)} = 2.4$ Hz.	59
Abbildung 41: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (RUN420b , reduzierter ROE-Satz, 16 RDCs, 96 Strukturen). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. In der rechten Bildhälfte (B) sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.	60
Abbildung 42: Energien der im RUN420b generierten Strukturen, welche mit 40 ROE- und 16 RDC-restraints erzeugt wurden. In der Farbe Rot ist der Tensor-, in Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Dunkelrot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.	60

Abbildung 43: RMSD-Werte berechnet aus den ausgegebenen Daten der XPLOR-violation-files (RUN420b). Die Werte liegen zwischen RMSD(min)= 0.01 Hz und RMSD(max)= 2.3 Hz.....	61
Abbildung 44: Korrelationen zwischen experimentellen und berechneten RDCs (Mittelwert) mit der Software RDC@hotFCHT. Dazu wurden die 20 besten energetischen Strukturvorschläge aus RUN420b verwendet. Die experimentellen Fehler sind auf der Abszisse und die Standardabweichungen der berechneten RDC-Werte auf der Ordinate durch die entsprechenden Fehlerbalken angezeigt.....	62
Abbildung 45: Graphische Darstellung der mit RDC@hotFCHT ermittelten RMSD-Werte. Dabei wurden die 20 energieärmsten Strukturen aus der Analyse 420b berücksichtigt. Die RMSD-Werte, welche mit 16 RDC-Kopplungen ermittelt wurden sind in blau, mit 20 rot und mit 23 grün angezeigt.	63
Abbildung 46: Korrelationen zwischen experimentellen und berechneten RDCs mit der Software RDC@hotFCHT. Dazu wurden die Strukturen 5 und 51 mit den besten RMSD-Werten unter Verwendung von 23 RDCs aus RUN420b genutzt. Die experimentellen Fehler sind auf der Abszisse und berechneten RDC-Werte auf der Ordinate mit den entsprechenden Fehlerbalken aufgetragen.....	64
Abbildung 47: Graphische Darstellung der Torsionswinkel ϕ und ψ im zyklischen Peptidrückgrat mit Fehlerindikatoren der besten 20 Strukturen. Die Koordinate $-69^\circ/ 72^\circ$ zeigt die Winkelkombination der inversen- γ -Schleife von Leu4 an.....	66
Abbildung 48: Darstellung der inversen γ -Schleife (γ_i) von Leu4 (i) am Beispiel von Struktur 84. Die ϕ - und ψ -Winkel von Pro5 (i+1) liegen im charakteristischen Bereich (bei einer L-Aminosäure).	67
Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der MGM-Analyse. Die peptidische Seitenkette wurde der Übersichtlichkeit wegen weggelassen. A : Überlagerung der jeweils 20 energieärmsten Strukturen aus 420a (40 ROEs, grau) und 420b (40 ROEs und 16 RDCs, grün) B : Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen aus 420a (40 ROEs, grau) mit der Struktur 5 (40 ROEs und 23 RDCs, grün) C : Überlagerung der Struktur 5 (40 ROEs und 23 RDCs, grün) mit der KURZ/ LANNES-Struktur (146 ROEs, grau, Abbildung 30) D : Überlagerung der drei besten Strukturen bzgl. des RMSD-Wertes ((5 (1.7 Hz), 51 (1.5 Hz), 84 (1.6 Hz)) (40 ROEs und 20 RDCs) E : Überlagerung der zwei besten Strukturen bzgl. des RMSD-Wertes ((5 (1.9 Hz), 51 (1.9 Hz)) (40 ROEs und 23 RDCs) mit den beiden Prolin-Ringkonformationen in der <i>down</i> -Position.	69
Abbildung 50: Obere Abbildung: Schematische Darstellung der durchgeführten MGM-Analyse. Untere Abbildung zeigt die Strukturvalidierung anhand des RMSD-Wertes mit RDC@hotFCHT. In schwarz sind die Strukturen welche mit 16 RDCs, in blau mit 20 RDCs (Pro5) und in grün mit 23 RDCs (Pro5 und 8) ermittelt wurden.	70
Abbildung 51: Konstitutionen der Hygrophoron-Derivate. A: mit Hydroxy- oder Acetoxy-Gruppe an C6 und B: mit zum Keton oxidierten C6.....	71
Abbildung 52: Diacetylhygrophorone A ¹² zur Bestimmung der relativen Konfiguration der Stereozentren C4, C5 und C6 mit Hilfe dipolarer Restkopplungen durch partielle Orientierung des Moleküls in einem geeigneten Medium.....	72
Abbildung 53: Bestimmung der Kopplungskonstante aus einem HETLOC-Experiment am Beispiel der ² J- (schwarz) bzw. ² T- Kopplung (rot) von C4 nach H3 von Diacetylhygrophorone A ¹² . Die	

gesuchte $^2J_{C_4H_3}$ Kopplungskonstante wurde wie angezeigt durch die doppelte Extraktion der 1D-Spur mit Peakmaximum aus dem 2D- Spektrum entnommen und gegeneinander verschoben bis sie deckungsgleich waren. Um eine bessere digitale Auflösung von J/ T zu erhalten, wurden die ausgewählten 1D-Spuren invers Fourier transformiert, ein Zero-Filling durchgeführt und wieder Fourier transformiert. Die Vorzeichen der Kopplungskonstanten wurden aus den Steigungen der Verschiebevektoren bestimmt, in dem gezeigten Beispiel waren beide Kopplungen T und J positiv.	73
Abbildung 54: Zyklisierungsreaktion am Beispiel von Dithienylcyclopenten-Derivaten, die im Arbeitskreis HECHT synthetisiert und gereinigt wurden. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zum Ringschluss. Nach dem Bestrahlen mit sichtbarem Licht öffnet sich der Ring wieder (reversibler Prozess). Dabei entspricht (p) der parallelen und (a-p) den antiparallelen Konformation(en).	82
Abbildung 55: Berechnete Konformere des <i>p</i> -Brom-substituierten <i>trans</i> -Diethyl-DTC-Derivats mit der Software SYBYL. ⁸⁵ Die linke Struktur entspricht der in Abbildung 54 gezeigten a-p, die mittige der p- und die rechte einer neuen, eher gemischten Anordnung.	83
Abbildung 56: Überlagerung des isotropen (blau) und anisotropen (rot) Protonenspektrums des <i>p</i> -Brom-substituierten <i>trans</i> -Diethyl-DTC-Derivats. Deutlich sind die extremen Peak-Verbreiterungen, die Hochfeldverschiebung (zum Teil um mehr als 0.6 ppm) und das Polymerrestsignal im Bereich von 0 bis 2 ppm erkennbar.	83
Abbildung 57: Änderung der Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittelsignals in PA. Zwischen den einzelnen Spektren (blau-rot-grün) liegen je etwa 12 Stunden.	84
Abbildung 58: Bestimmung der $^1J_{C-C}$ und $^1T_{C-C}$ -Kopplungskonstante aus einem isotropen (schwarz) und anisotropen (rot) 1,1-ADEQUATE- Spektrum von Dithienylcyclopentenderivates. Obwohl die anisotropen Kopplungen sehr breit sind, können die totalen Kopplungskonstanten präzise entnommen werden. Die $^1J_{C-C}$ -Kopplungen sind immer positiv. Somit ergeben sich im Fall schwacher Orientierung der Betrag und das Vorzeichen von $^1D_{C-C}$, analog zum CLIP/ CLAP-HSQC, direkt aus der Änderung der Linienaufspaltung.	85
Abbildung 59: Überlagerte CLIP-HSQC-Spektren isotrop (blau)/ anisotrop (rot) in PDMS/ $CDCl_3$ (300K) zur Bestimmung der heteronuklearen $^1J_{CH}$ und $^1T_{CH}$ Kopplungen.	111
Abbildung 60: Überlagerte CLIP-HSQC-Spektren Spektren isotrop/ anisotrop in PDMS/ $CDCl_3$ (300K) zur Bestimmung der heteronuklearen $^1J_{NH}$ (schwarz) und $^1T_{NH}$ (rot) Kopplungen.	111
Abbildung 61: Einstellungsparameter des <i>conformational-search</i> Moduls der Software Maestro-Schrodinger-Suite 2012. ⁸⁷ Diese wurden sowohl bei den Konformationsanalysen von DTC als auch von Methylgriselimycin verwendet.	112
Abbildung 62: Prolin -Ringkonformationen und Atombezeichnungen (bezieht sich auf Tabelle 23). Oberer Abbildung wurde aus <i>J. Biomol. NMR</i> 1995 , 6, 123-128 ²⁰² entnommen. Die Abdruckerlaubnis liegt vor.	148

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht und Beschreibung der wichtigsten Alignment-Tensorkomponenten bei der RDC-Analyse.....	17
Tabelle 2: Auswahl an zweidimensionalen NMR-Experimenten zur Bestimmung von Kopplungskonstanten für die RDC-Analyse. Eine gesamtheitliche Übersicht über die weitreichenden Protonen-Kohlenstoffkopplungen mit entsprechenden Anwendungen bietet auch der Artikel von PARELLA und ESPINOSA in der Zeitschrift „Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy“.....	31
Tabelle 3: Prominente Beispiele von RDC-Analysen an niedermolekularen Verbindungen. In der Pharmakologie und Biochemie werden Moleküle mit einer Molmasse von weniger als 800 g/Mol als niedermolekular bezeichnet. An dieser Stelle werden zusätzlich auch kleine Peptide mitangeführt, da sie auch in organischen Lösungsmitteln (mit Alignmentmedium) gemessen wurden.....	42
Tabelle 4: D_{CH} -RDCs (Hz) für MGM in PDMS/ $CDCl_3$ -Gel bei einer Quadrupolaufspaltung von $\nu_Q=16$ Hz. Die RDCs der Methylgruppen wurden in die entsprechenden CC- bzw. NC-Kopplungen umgerechnet. ¹³⁰ Für die XPLOR-Berechnungen wurden softwarebedingt reduzierte RDC-Werte verwendet, weil hier die gyromagnetischen Verhältnisse nicht berücksichtigt werden.....	50
Tabelle 5: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen mit RDC@ <i>hotFCHT</i> . Die Konformere R100-R950 entsprechen den in der Abbildung 30 gezeigten Strukturen (best-fit R600= 0.678).	51
Tabelle 6: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen mit RDC@ <i>hotFCHT</i> . Die Konformere entsprechen einer Auswahl der in Abbildung 33 gezeigten Strukturen. Der RMSD-Wert [Å] bezieht sich auf die Güte der Überlagerung des zyklischen Rückgrats. Als Referenzstruktur wurde das Konformer 1 gewählt.....	54
Tabelle 7: Torsionswinkel ϕ , ψ und ω des zyklischen Peptidrückgrats (RUN420b). Die Winkel sind Mittelwerte über die energieärmsten 20 Strukturen. Die Standardabweichungen sind in der jeweils nachfolgenden Spalte gezeigt.....	65
Tabelle 8: Ermittelte RDCs aus den CLIP-HSQC ¹²⁷ (fett) und HETLOC-Spektren. ^{132,133} Die Atombezeichnungen beziehen sich auf die in Abbildung 52 gezeigte Nomenklatur.....	73
Tabelle 9: Distanzabstände zwischen den Atomen 1 und 2 in Ångström [Å], welche für die MD-Simulation und anschließende Energieminimierung in 4.3.1 verwendet wurden. Exp-Dist entsprechen dabei den experimentellen Abständen, Lower sind die bei der Berechnung verwendeten unteren Grenzen (entspricht dem experimentellen Abstand minus 10%) bzw. Upper die oberen Grenzen (entspricht dem experimentellen Abstand plus 10% (plus Pseudoatomkorrektur). Av_Viol gibt den Fehler der experimentellen restraints der zehn energieminimierten Strukturen wieder.....	99
Tabelle 10: Torsionswinkel ϕ , ψ , ω der 10 generierten ROE/MD (SYBYL)-Strukturen (zyklischer Teil). Zusätzlich sind im unteren Teil der Tabelle die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Winkel angezeigt.	104
Tabelle 11: Chemische Verschiebungen von Methylgriselimycin in $CDCl_3$ bei 300 K. Die chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan (TMS) referenziert.	105

Tabelle 12: Gesamtheit aller bestimmten RDCs von MGM in PDMS-Gel in CDCl ₃ (D(eff)). Kopplungen die aufgrund von Signalüberlagerungen oder auch nicht zugeordnet werden konnten sind mit einem n.d. (not determined) gekennzeichnet. Die RDCs der N-Methylgruppen bzw. C-Methylgruppen wurden in die entsprechenden internuklearen N-C bzw. CC-Vektoren umgerechnet. Alle Kopplungen sind in der Einheit Hz angegeben.....	108
Tabelle 13: Ergebnisse der MGM-Konformationsanalyse (Suchmethode Mixed-torsional/ Low-mode-sampling, Kraftfeld OPLS_2005) mit der Software Maestro-Schrödinger Version 9.3.5. Insgesamt wurde 165 Strukturen generiert.....	113
Tabelle 14: Torsionswinkel ϕ , ψ , ω des zyklischen Peptidrückgrats ausgewählter Strukturen. Sie wurden mit der <i>conformational</i> -search-Methode mit Maestro-Schrödinger erzeugt.....	119
Tabelle 15: Übersicht über die von XPLOR-ausgegebenen Energieterme in kcal/mol (RUN317). Bei der Berechnung wurde der komplette ROE-Datensatz verwendet. Alle Energieterme sind in [kcal/mol] angegeben.	121
Tabelle 16: Energieterme aus dem RUN320. Es wurden alle ROE-Werte und die 16 RDC-Werte bei der Analyse verwendet. Alle Energieterme sind in [kcal/mol] und der RMSD in [Hz] angegeben.	125
Tabelle 17: Energieterme aus dem RUN420a. Es wurde der reduzierte ROE-Datensatz bei der Analyse verwendet. Alle Energieterme sind in [kcal/mol] angegeben.....	129
Tabelle 18: Energieterme aus der Analyse RUN420b. Bei der Berechnung wurde der reduzierte ROE- und der RDC-Datensatz verwendet. Die generierten Strukturen weisen ein Strukturkontinuum auf sind nicht mehr geclustert. Der ROE-Anteil an der Gesamtenergie ist deutlich geringer als bei der Verwendung des kompletten ROE-Datensatzes. Alle Energieterme sind in [kcal/mol] und der RMSD in [Hz] angegeben.	133
Tabelle 19: ROE-Verletzungen aus den XPLOR-Violation Files der einzelnen Strukturen der Analyse 420b. Die Abstandsdistanzen sind in [Å] der Energiewert in [kcal/mol] angegeben.....	137
Tabelle 20: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@ <i>hotFCHT</i> , bei der Verwendung von 16 RDCs (Rückgrat).....	145
Tabelle 21: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@ <i>hotFCHT</i> , bei der Verwendung von 20 RDCs (Rückgrat und Prolin 5).....	146
Tabelle 22: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@ <i>hotFCHT</i> , bei der Verwendung von 23 RDCs (Rückgrat und Prolin 5 und 8).....	147
Tabelle 23: Vergleich der TOCSY- Peakintensitäten und ³ J _{HH} - Kopplungskonstanten mit Literaturdaten [in der Spalte I-TOCSY-gefordert (UP/ DOWN) und K-gefordert (UP/ DOWN)] aus <i>J. Biomol. NMR</i> 1995 , 6, 123-128. ²⁰²	148

Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
ADEQUATE	Adequate sensitivity Double-QUAnTum spEctroscopy
a-p	antiparallel
bzgl.	bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
CDCl ₃	Chloroform (deutert)
CD ₂ Cl ₂	Methylenchlorid (deutert)
Cdih	Dihedral Angle Restraints
CHARMM	Chemistry at HARvard Molecular Mechanics
CLAP	CLeAn Anti-Phase
CLIP	CLeAn In-Phase
COSY	CORrelated SpectroscopY
CSA	Chemical Shift Anisotropy
DFT	Density Functional Theory
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTC	Dithienylcyclopentene
E.COSY	Exclusive CORrelation SpectroscopY
FF	Force Field
FWHM	Full Width at Half Maximum
HECADE	HEteronuclear Couplings from ASSCI-Domain experiments with E.COSY-type crosspeaks
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
INADEQUATE	Incredible Natural Abundance Double-QUAnTum Transfer Experiment
I	Intensität
J	skalare Kopplungskonstante
LMOD	Low Mode

LLMOD	Large scale Low Mode
MC	Monte Carlo
MCMM	Monte Carlo Multiple Minimum
MCMT	Multi Conformer Multi Tensor
MCST	Multi Conformer Single Tensor
MD	Molecular Dynamics
MGM	MethylGriseliMycin
MM	Molecular Mechanics
MS	MassenSpektrometrie
MW	Mittelwert
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY
OPLS	Optimized Potentials for Liquid Simulations
p	parallel
PA	Polyacetylen
PBLG	Poly- γ -benzyl-L-glutamat
PBDG	Poly- γ -benzyl-D-glutamat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PELG	Poly- γ -ethyl-L-glutamat
PFGSE	pulsed field gradient spin echo
Q-Faktor	Qualitätsfaktor
R	Pearsson'scher Korrelationskoeffizient
RCSA	Residual Chemical Shift Anisotropy
RDC	Residual Dipolar Coupling
RMSD	Root Mean Square Deviation
ROE	Rotating frame Overhauser Effect
ROESY	Rotating frame Overhauser Effect SpectroscopY
SAG	strain induced alignment in a gel
Sani	susceptibility anisotropy

SCST	Single Conformer Single Tensor
SVD	Singular Value Decomposition
T	totale Kopplung
TOCSY	TOtal Correlation SpectroscopY
vdW	van der Waals
γ	gyromagnetische Verhältnis
δ	chemische Verschiebung
η	NOE-Verstärkung
φ	Phi-Diederwinkel (C-N-C _{α} -C) (Peptidrückgrat)
ψ	Psi-Diederwinkel (N-C _{α} -C-N) (Peptidrückgrat)
ω	Omega-Diederwinkel (C _{α} -C-N-C _{α}) (Peptidrückgrat)

1. Einleitung

„Während meines Aufenthaltes in London wohnte ich längere Zeit in Clapham Road in der Nähe des Common. Die Abende aber verbrachte ich vielfach bei meinem Freund Hugo Müller in Islington, dem entgegengesetzten Ende der Riesenstadt. Wir sprachen da von mancherlei, am meisten aber von unserer lieben Chemie. An einem schönen Sommertage fuhr ich wieder einmal mit dem letzten Omnibus durch die zu dieser Zeit öden Straßen der sonst so belebten Weltstadt; ‘outside’, auf dem Dach des Omnibus, wie immer. Ich versank in Träumereien. Da gaukelten vor meinen Augen die Atome. Ich hatte sie immer in Bewegung gesehen, jene kleinen Wesen, aber es war mir nie gelungen, die Art ihrer Bewegung zu erlauschen. Heute sah ich, wie vielfach zwei kleinere sich zu Pärchen zusammenfügten; wie größere zwei kleine umfassten, noch größere drei und selbst vier der kleinen festhielten, und wie sich Alles in wirbelndem Reigen drehte. Ich sah, wie größere eine Reihe bildeten und nur an den Enden der Kette noch kleinere mitschleppten. Ich sah, was Altmeister Kopp, mein hochverehrter Lehrer und Freund, in seiner „Molecularwelt“ uns in so reizender Weise schildert; aber ich sah es lange vor ihm. Der Ruf des Conducteurs: „Clapham road“ weckte mich aus meinen Träumereien, aber ich verbrachte einen Theil der Nacht, um wenigstens Skizzen jener Traumgebilde zu Papier zu bringen. So entstand die Structurtheorie.“^{1,2}

Mit diesen Worten beschrieb August Kekulé im Jahre 1890 in einer Rede zum Anlass „25 Jahre Benzolfest“ seine anfänglichen Gedanken, welche schließlich in der klassischen chemischen Strukturlehre mündeten. KEKULÉ und seinen Kollegen ist es bereits in der Mitte des 19. Jahrhunderts gelungen, den organischen Molekülen entsprechend ihrer atomaren Zusammensetzung eine eindeutige Konstitution zuzuordnen. Mit dieser Klassifizierung der organischen Verbindungen konnten nun im Detail die Art und Anzahl der Atome in den Molekülen und die zwischen den Atomen existierenden kovalenten Bindungen festgelegt werden. Diese zweidimensionalen Darstellungen von Molekülen beinhalteten jedoch keine stereochemischen Aspekte, welche maßgeblich für deren physikalischen und chemischen Eigenschaften verantwortlich sind. Es waren vor allem VAN’T HOFF und LE BEL die unabhängig voneinander am Beispiel des vierbindigen Kohlenstoffs den Begriff der Konfiguration prägten.³ Die Konfiguration eines Moleküls legt die eindeutige räumliche Orientierung der Atome oder Atomgruppen fest. Bei der Festlegung der entsprechenden Konfiguration im Molekül werden jedoch keine Rotationen um Einfachbindungen von Atomen oder Atomgruppen im Molekül berücksichtigt. Während VAN’T HOFF noch von einer uneingeschränkten Drehbarkeit um Einfachbindungen ausging, konnte im Jahr 1922 von CHRISTIE und KENNER am Beispiel von 6,6’-Dinitro-2,2’-diphenylsäure gezeigt werden, dass durchaus eingeschränkte Rotation um Einfachbindungen in Molekülen auftreten kann (Atropisomerie).^{3,4} Dies war ein erstes Indiz dafür, dass neben den eher statischen Parametern wie Konstitution und Konfiguration auch die dynamischen Parameter bei der Beschreibung der Molekülgeometrien zu berücksichtigen sind. Diese ganzheitliche Betrachtung der Molekülgeometrie, einschließlich der frei drehbaren Bindungen, wird als Konformation bezeichnet. Der Begriff wurde bereits im Jahre 1929 von HAWORTH, nach dem auch die Darstellungsweise (Haworth-Formel) für ringförmige fünf- und sechsgliedrige Moleküle in ihrer zyklischen Form benannt ist, im Rahmen seiner Zuckerchemieforschung verwendet.^{3,5} Zusammengefasst beschreibt also die Konformation eines organischen Moleküls die räumliche Anordnung der drehbaren Bindungen an den Kohlenstoffatomen. Durch die Kombination dieser drei Ebenen der Strukturbeschreibung (Konstitution, Konfiguration und Konformation) sind die dreidimensionalen Raumkoordinaten aller Atome eines Moleküls eindeutig beschrieben.

Mit der stetigen Entwicklung der physikalischen Messmethoden konnten die zunächst empirisch ermittelten Befunde in der Strukturtheorie auch experimentell nachgewiesen werden. Ein halbes Jahr

nach KEKULÉ's Tod im Jahre 1896 wurden die Röntgenstrahlen entdeckt und wenige Jahre später beobachteten LAUE, FRIEDRICH und KNIPPING die ersten Röntgeninterferenzen an Kristallen.⁶ In den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelte sich daraus die Röntgenkristallstrukturanalyse mit deren Hilfe erstmals eine genaue experimentelle Bestimmung der Bindungsabstände und Valenzwinkel zwischen Atomen in Festkörpern möglich wurde.⁶ In den folgenden Jahrzehnten wurden rasch weitere Verfahren zur Lösung von Strukturfragen entdeckt und weiterentwickelt, wie zum Beispiel die Bestimmung der Dipolmomente und die Polarisierbarkeit von organischen Molekülen (DEBEYE), die Elektronenbeugung an Gasen oder auch die Analyse der Rotations- und Schwingungsspektren von organischen Molekülen.⁶ Insbesondere eine physikalische Messmethode hat jedoch die Strukturanalytik nachhaltig revolutioniert. Um die Jahreswende 1945/ 46 wurden von PURCELL und BLOCH (Nobelpreis Physik 1952) unabhängig voneinander die ersten erfolgreichen NMR-Messungen (*Nuclear Magnetic Resonance*) an kondensierter Materie durchgeführt.^{7,8,9} Nach der Beobachtung des Phänomens der chemischen Verschiebung (δ), welche die Grundlage für die Anwendung der NMR-Spektroskopie in der organischen Chemie bildet, kamen anschließend die Spin-Spin-Kopplung und die dynamische NMR-Spektroskopie hinzu. Es folgte die Entwicklung der Fouriertransformations-Methode, der Kryotechnik bis hin zur Aufnahme von mehrdimensionalen Spektren die heute Empfindlichkeiten und spektrale Dispersionen liefern, welche noch wenige Jahrzehnte zuvor undenkbar waren. Durch diese rasante Entwicklung erweiterte sich das Aufgabengebiet der NMR-Spektroskopie von der Molekülstrukturaufklärung u.a. auch auf das Studium von biochemischen, medizinischen und physiologischen Prozessen im Körper (*in vivo*). Welche Bedeutung letztendlich der NMR-Spektroskopie in der Chemie, Biochemie und Medizin beigemessen wird, kann auch anhand der Anzahl der Nobelpreise (1991 ERNST (Chemie), 2002 WÜTHRICH (Chemie), 2003 LAUTERBUR/ MANSFIELD (Medizin)) ersehen werden.

Trotz der großen Fortschritte in anderen Forschungsbereichen ist und bleibt die Strukturermittlung (Konstitution, relative Konfiguration und Konformation) von Molekülen eines der wichtigsten Aufgabengebiete. Hierzu stehen zahlreiche NMR-Experimente zur Verfügung.¹⁰ Neben den etablierten eindimensionalen NMR-Methoden wie z.B. das ¹H-NMR und ¹³C-NMR haben sich in den letzten vier Jahrzehnten mehr und mehr die mehrdimensionalen Methoden durchgesetzt. Heutzutage kann die Konstitution kleiner organischer Moleküle in Lösung mit wenigen zweidimensionalen NMR-Experimenten¹¹ in der Regel eindeutig und schnell bestimmt werden (siehe auch Kapitel 3.1). Für die Ermittlung der Konfiguration und Konformation ist die Bestimmung der ³J-Kopplungskonstante und der Kern-OVERHAUSER-Effekt¹² (*Nuclear Overhauser Effect*, *NOE*) bzw. ROE-Effekt (*Rotating frame Overhauser Effect*, *ROE*), der auf der dipolaren Spin-Spin Kopplung beruht, meist von entscheidender Bedeutung. Mit Hilfe dieser Wechselwirkungen können je nach Fragestellung qualitative oder quantitative Distanzinformationen im Molekül bestimmt werden. Kombiniert man die aus den Experimenten gewonnenen Winkel-, Bindungs- und Distanzinformationen und setzt die einzelnen Fragmente zusammen, kann ein wesentlicher Teil der strukturellen Fragestellungen von kleinen, organischen Molekülen beantwortet werden.

Deutlich komplizierter bzw. aufwendiger wird es jedoch, wenn die Moleküle, etwa durch hochsubstituierte stereochemische Zentren oder auch durch eingebrachte Heteroatome, Lücken im Kopplungspfad aufweisen oder wenn die NOEs nicht eindeutig bestimmten Protonen zuzuordnen sind. Die notwendigen Bindungswinkel und Distanzen in den einzelnen Molekülteilen sind dann nicht immer eindeutig bestimmbar, wodurch strukturelle Aussagen nur bedingt, manchmal auch gar nicht möglich sind. Zusätzliche Schwierigkeiten bereiten auch Moleküle mit konformationeller Flexibilität, da für sie nur gemittelte Parameter erhalten werden. In diesen Fällen hat sich in der jüngeren Vergangenheit ein zusätzlicher anisotroper NMR-Parameter bewährt. Die residualen dipolaren Kopplungen (*Residual Dipolar Coupling*, *RDCs*) liefern, anders als die lokalen NOE-Distanzen, aussagekräftige Strukturinformationen in einem globalen Kontext.^{13,14,15} Diese geben die

gesamtheitliche relative räumliche Anordnung von Atomen in einem Molekül wieder, beschreiben also somit die Konfiguration und die Konformation(en) des gesamten Moleküls.¹⁶

Schon in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts hatte SAUPE^{17,18} herausgefunden, dass NMR-Spektren, die in einer anisotropen Phase aufgenommen werden, zusätzliche Strukturinformationen enthalten. Die von SAUPE verwendeten stark orientierenden flüssigkristallinen Phasen führen jedoch aufgrund der großen dipolaren Kopplungen zu komplizierten Spektren, welche häufig nur schwierig zu interpretieren sind. In den neunziger Jahren wurde dann ein neuer Ansatz verfolgt. In der Strukturbiologie setzte man erstmals wasserbasierte, schwach orientierende Medien ein, die eine entsprechend niedrige Orientierung bei den untersuchten Analyten (vorwiegend biologische Makromoleküle) induzierten.^{19,20} Mit diesen neuen Orientierungsmedien verringerte sich der Ordnungsgrad der Analyten um ein vielfaches, sodass die RDCs nun als zusätzlicher Beitrag zur Linienaufspaltung aus den NMR-Spektren entnommen werden konnten. Um die Vorteile dieser Methode auch bei kleinen Molekülen nutzen zu können, mussten spezielle Orientierungsmedien, die Kompatibilität mit organischen Lösungsmitteln und einen niedrigen Ordnungsgrad aufweisen, entwickelt werden. Bereits Anfang 2000 konnten mit dem *Poly-γ-benzyl-L-glutamat* (PBLG) als schwachem Orientierungsmedium (Ordnungsparameter $S < 10^{-3}$) erste Erfolge erzielt werden.^{21,22} Die Optimierung bestehender und Entwicklung neuer Medien waren die Grundlage für den anschließenden großen Erfolg der Methode in der Strukturanalytik. Neben der Bestimmung von relativen Konfigurationen und der Zuordnung von diastereotopen Protonen an starren bzw. eher wenig flexiblen Molekülen hat sich der neue RDC-Ansatz^{23,24} auch schon bei der Konstitutionsbestimmung eines unbekannten Synthesenebenproduktes bewährt.²⁵ Während die Strukturanalyse mittels RDCs für eher starre Moleküle heute annähernd „state-of-the-Art“ ist, stellt die Untersuchung von flexiblen, dynamischen, Molekülen noch immer eine besondere Herausforderung dar. Die Abstände und Winkel zwischen den flexiblen Molekülteilen können nicht mehr als zeitlich konstant angesehen werden und die Gesamtanzahl an Konformeren ist häufig ebenfalls unbekannt. Daher ist die Untersuchung von kleinen organischen Molekülen und vor allem auch kleinen Peptiden mittels NMR immer noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

2. Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zur weiteren Evaluierung der RDC-Methode kleine Moleküle unterschiedlichster Herkunft und Funktion studiert. Das übergeordnete Ziel dabei war es, neue weiterführende aber auch praktische Erkenntnisse in der RDC-Untersuchung bezüglich der Anwendbarkeit und Methodik zu erhalten. Dabei soll an drei konkreten Beispielen aus Forschung und Entwicklung evaluiert werden, wie sich die RDC-restraints bei der Konfigurations- vor allem aber auch bei der Konformationsanalyse als zusätzlicher NMR-Parameter im Vergleich zu den NOEs bewähren. Zusätzlich soll an einem zyklischen Peptid konkret untersucht werden, inwieweit die RDC-Methode zur Strukturverfeinerung beitragen kann. Die einzelnen Projekte sind im Folgenden kurz aufgelistet und beschrieben.

- Methylgriselimycin (MGM) ist ein zyklisches Depsipeptid aus der Familie der Griselimycine²⁶ welches eine hohe Aktivität gegen *M. tuberculosis* aufzeigt. Somit ist das Molekül ein vielversprechender Wirkstoffkandidat.²⁷ Um einen tieferen Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu erhalten und die Anwendbarkeit der RDC-Methode auf kleine zyklische Peptide zu erforschen, soll die Ringkonformation des Peptidrückgrats in einer RDC-Analyse, ausgehend von einem Strukturensamble welches 2011 im Rahmen einer Masterthesis von LANNES und KURZ durch NOE-restraint basierte MD-Simulation generiert wurde²⁸, bestimmt werden.

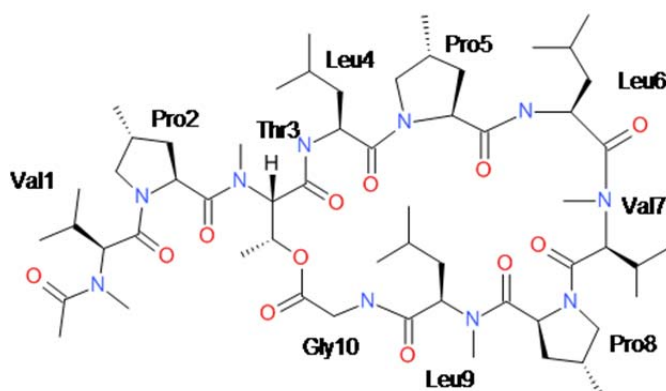


Abbildung 1: Methylgriselimycin aus der Familie der Griselimycine. Methylgriselimycin unterscheidet sich vom Griselimycin durch die Anwesenheit von *L*-(*R*)-4-methylprolin anstatt *L*-Prolin an Position 8 der Aminosäuresequenz.

- Aus den Pilzen der Gattung *Hygrophorus* (Schnecklinge) konnten 2004 zwanzig neue Substanzen (Hygrophorone) isoliert werden, die vielleicht als Leitstrukturen für neue Antibiotika dienen können.²⁹ Die Relativkonfiguration des untersuchten 4,6-Diacetylhygrophorone A¹² von zwei der insgesamt drei Stereozentren konnte bereits mit Hilfe der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie und anschließendem Literaturdatenvergleich postuliert werden. Die Relativkonfiguration am dritten Stereozentrum, welches sich an der flexiblen

Seitenkette befindet, ist mit klassischen NMR-Methoden nicht zugänglich und soll mit Hilfe der RDC-Analyse bestimmt werden.

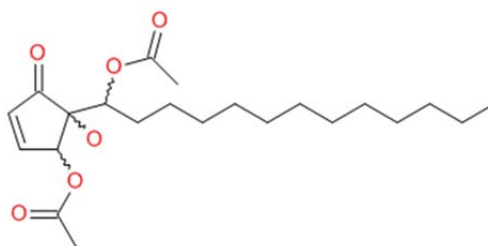


Abbildung 2: 4,6-Diacetylhygrophorone A¹² aus der Gruppe der Hygrophorone mit zwei endozyklischen und einem exozyklischen Stereozentrum. Die Relativkonfiguration am exozyklischen Stereozentrum ist unbekannt.

- Dithienylcyclopentene sind eine Verbindungsklasse von Molekülen, welche unter Lichteinfall ihren Isomerisierungszustand reversibel ändern können und gehören daher zu der Klasse der photochromen Moleküle. Sie können in zwei Formen existieren, einer farblosen, offenen Form und einer farbigen, geschlossenen Form. Die Zyklisierungsreaktion von der offenen in die geschlossene Form wird durch UV-, die Ringöffnung durch Licht im sichtbaren Bereich (VIS) induziert.^{30,31} Um die Effizienz des Ringschlusses zu steigern, wurden u.a. Methylgruppen am Cyclopentenring eingeführt um die Rotation der beiden Seitenketten einzuschränken, denn nur die antiparallelen Anordnungen führen zum erwünschten Ringschluss (siehe Abbildung 3). Anhand von präzisen NOE-Messungen und einer RDC-Analyse sollen die in Lösung vorliegenden Konformere und deren Einfluss auf das Schaltverhalten untersucht werden.

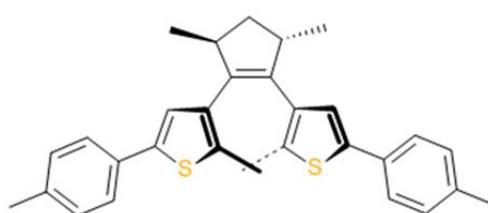


Abbildung 3: Offene Form von Dimethyldithienylcyclopenten. Die beiden Methylgruppen an der Cyclopenten-Einheit sind *trans*-konfiguriert. Gezeigt ist hier eine antiparallele Konformation, welche nach Bestrahlung mit UV-Licht zum Ringschluss führt.

3. Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel werden die wichtigsten theoretischen Grundlagen und Methoden beschrieben, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Neben der klassischen Strukturaufklärung von kleinen Molekülen und Peptiden wird besonders auf die Verfahren und Methoden der RDC-Analyse eingegangen. Dies reicht von der Vorstellung gängiger aber auch neuer Ausrichtungsmedien (Alignment-Medien), über die theoretischen Konzepte der RDC-Auswertemethoden bis hin zur Strukturgenerierung mittels *in silico*-Methoden. Am Ende dieses Kapitels werden dann noch einige praktische Aspekte aktueller Forschungsprojekte vorgestellt, welche sich mit der RDC- und NOE-Strukturaufklärung von Naturstoffen und kleinen Peptiden beschäftigen. Abgeschlossen wird dieses Kapitel mit einer tabellarischen Übersicht über die bisher mit RDC-Methoden bearbeiteten kleinen und mittelgroßen Moleküle um einen Gesamtüberblick über den Stand der bisher publizierten Arbeiten zur Strukturaufklärung mit RDCs zu geben.

3.1. Strukturaufklärung kleiner Moleküle und Peptide mittels klassischer NMR-Experimente und Methoden

Die Ermittlung der Konstitution ist der erste Schritt bei der Strukturanalyse von organischen Molekülen. Neben der Massenspektrometrie leistet die NMR-Spektroskopie einen entscheidenden Beitrag dazu. Dabei werden eindimensionale ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren, aus denen die chemischen Verschiebungen (δ), die indirekte Spin-Spin-Kopplungen (J) und die Anzahl der Protonen- und Kohlenstoffatome ermittelt werden, durch mehrdimensionale Experimente ergänzt. Diese Experimente ermöglichen den Zugang zu den indirekten (skalaren) Spin-Spin-Kopplungen benachbarter Kerne. Zunächst werden die wichtigsten zweidimensionalen (2D)-Experimente kurz vorgestellt.

Mit dem homonuklearen COSY^{32,33} (**CORrelation SpectroscopY**) und TOCSY^{34,35} (**TOTal Correlation SpectroscopY**) Experiment werden meist die indirekten Proton-Proton-Verknüpfungen über die skalare J -Kopplung ermittelt. Im Gegensatz zum COSY ($^2J_{\text{H-H}}$ bzw. $^3J_{\text{H-H}}$) kann im TOCSY-Experiment durch eine geeignete Wahl der Mischzeit τ_m die Magnetisierung auch über ein komplettes Spinsystem übertragen werden. Daher ist das TOCSY-Experiment auch besonders gut für die Konstitutionsermittlung von Peptiden und Proteinen geeignet, da hier die Spinsysteme der einzelnen Aminosäuren isoliert sind und so in den Spektren charakteristische Muster ergeben. Es können jedoch nicht alle Aminosäuren eindeutig identifiziert werden, da zum Beispiel die Aminosäuren mit nur einer CH_2 -Gruppe als Seitenkettenspinsystem wie zum Beispiel Ser, Cys, Asp, Asn, His, Trp, Phe, Tyr sehr ähnliche Muster aufweisen.

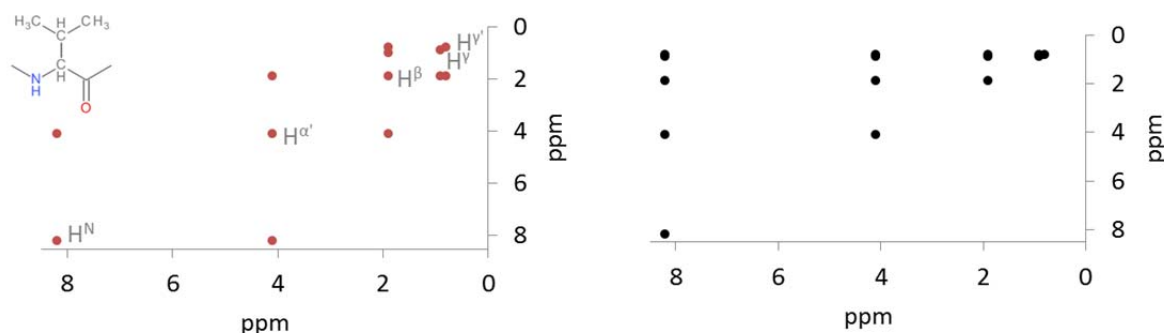


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Aminosäure Valin in einem 2D-COSY-Spektrum (linke Abbildung) und einem 2D-TOCSY-Spektrum (rechte Abbildung).³⁶ Das komplette Spinsystem von Valin ist im TOCSY erkennbar. Die unterhalb der Diagonalen liegenden Signale des TOCSY-Spektrums wurden der Übersicht wegen weggelassen.

Die Verknüpfungen zwischen ^{13}C -Kernen ($^1\text{J}_{\text{C-C}}$ bzw. $^n\text{J}_{\text{C-C}}$) können zum Beispiel durch das heteronukleare ADEQUATE^{37,38} (*Adequate sensitivity Double QU AnTum spEctroscopy*) und das homonukleare INADEQUATE³⁹ (*Incredible Natural Abundance Double QUAntum Transfer Experiment*) Experiment bestimmt werden. Zwar ist das ADEQUATE aufgrund der Protonenanregung und -detektion im Vergleich zum INADEQUATE etwas empfindlicher, nachteilig ist aber, dass die Konnektivitäten zwischen benachbarten quartären Kohlenstoffen nicht gemessen werden können. In der Praxis spielen die beiden Experimente aufgrund der geringen Empfindlichkeit und daraus resultierenden langen Messzeiten nur eine untergeordnete Rolle.

Für die Detektion der heteronuklearen $^1\text{J}_{\text{C-H}}$ Verknüpfung im Molekül wird das HSQC^{40,41} (*Heteronuclear Single-Quantum Coherence*) bzw. HMQC^{40,42} (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) Experiment verwendet. Weitreichende $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ manchmal auch $^4\text{J}_{\text{C-H}}$ -Kopplungen detektiert man mit dem HMBC⁴³ (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) Experiment. Diese Informationen sind besonders für die Verknüpfung der einzelnen Spinsysteme im Molekül und auch für die Ermittlung und Zuordnung der quartären Kohlenstoffe erforderlich. Eine Unterscheidung zwischen den $^2\text{J}_{\text{C-H}}$, $^3\text{J}_{\text{C-H}}$ und $^4\text{J}_{\text{C-H}}$ Kopplungen ist in diesem Spektrum meist nicht möglich. Alle drei beschriebenen heteronuklearen Experimente sind protonendetektiert und werden routinemäßig in der Strukturaufklärung eingesetzt.

Je nach Fragestellung und Molekül kann nach der Festlegung der Konstitution die relative Konfiguration stereogener Zentren und die Konformation ermittelt werden. Hierzu müssen möglichst viele Winkel- und Abstandsinformationen bestimmt werden, um die Molekülgeometrie eindeutig wiedergeben zu können.

Die vicinalen Proton-Proton-Kopplungskonstanten ($^3\text{J}_{\text{H-H}}$), die zum Beispiel aus den ^1H -Spektren ermittelt werden können, liefern Informationen über den Torsionswinkel φ (Diederwinkel), den die beiden Protonen einschließen. Dadurch können Rückschlüsse auf die Molekülgeometrie (siehe auch Abbildung 5) gezogen werden. Dieser Zusammenhang zwischen Kopplungskonstante und Torsionswinkel wurde erstmals von KARPLUS^{44,45} theoretisch beschrieben.

$$^3\text{J}_{\text{H-H}} = A \cos^2 \varphi + B \cos \varphi + C \quad \text{Formel 1}$$

Neben dem Torsionswinkel ist die Größe der $^3\text{J}_{\text{H-H}}$ -Kopplungskonstante von den benachbarten Substituenten, dem C-C-Abstand und dem H-C-C-Valenzwinkel abhängig, was eine individuelle Anpassung der Parameter A, B und C auf das zu untersuchende System bedingt.¹¹ Es existiert eine große Zahl an empirisch abgeleiteten Parametrisierungen, so zum Beispiel für die ^3J -Kopplungskonstanten zwischen den Amidprotonen und den α -Protonen $^3\text{J}_{\text{HN-H}\alpha}$ in Peptiden und Proteinen.^{46,47,48} Deren Bestimmung kann zum Beispiel bei der Strukturanalyse des Rückgrats von Peptiden und Proteinen ein wichtiger Schritt sein. Der Zusammenhang ist in Abbildung 5 an einem Peptid mit der Karplus-Beziehung $^3\text{J}_{\text{H-H}(\varphi)} = 6.4 \cos^2 (\varphi - 60) - 1.3 \cos (\varphi - 60) + 1.5$ schematisch gezeigt.³⁶ Darin wird auch ersichtlich, dass aufgrund des trigonometrischen Zusammenhanges bis zu vier verschiedene Diederwinkel je gemessener Kopplungskonstante existieren.

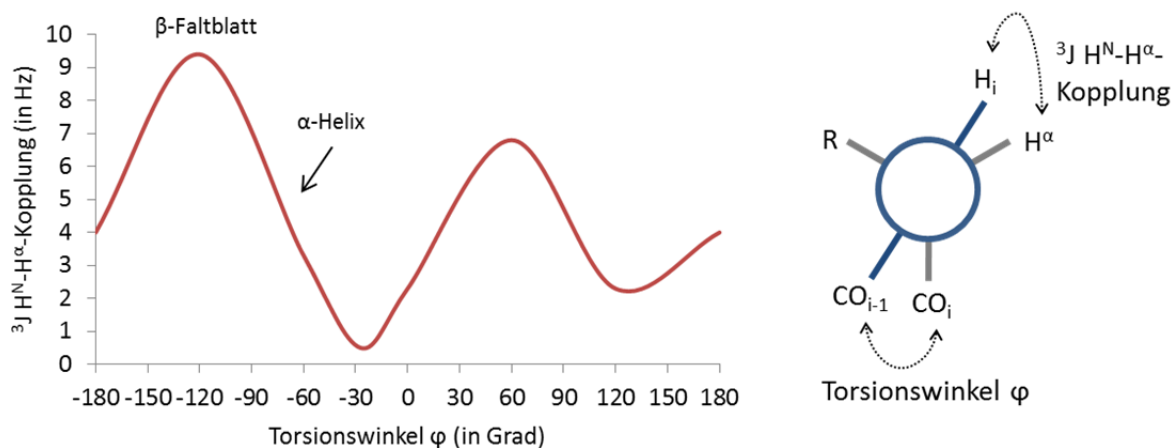


Abbildung 5: Links: Beispiel zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der Kopplungskonstante $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ und dem Torsionswinkel zwischen CO_i und CO_{i-1} (rechte Abbildung) an einem Peptid. Für eine gemessene Kopplungskonstante existieren zwischen zwei und vier Torsionswinkel. Rechts: Newman-Projektion entlang der $\text{C}\alpha\text{-N}$ -Achse. Der Index i bezeichnet die Stellung der Aminosäure in der Sequenz. (Schema nach Lottspeich)³⁶

Bei Flexibilität im Molekül können manchmal nur gemittelte Kopplungskonstanten im NMR-Experiment bestimmt werden, zum Beispiel wenn sich die verschiedenen Konformere bei Raumtemperatur schnell ineinander umwandeln. Ein Rückschluss auf die Torsionswinkel der einzelnen Konformere anhand der gemittelten Kopplungskonstanten alleine ist hier nicht möglich. Sind jedoch die Molenbrüche x der am Ensemble beteiligten Konformere bekannt, setzt sich die gemessene Kopplungskonstante additiv wie folgt zusammen:

$$^3J = x_1J_1 + x_2J_2 + \dots + x_nJ_n \quad \text{Formel 2}$$

Da sich die Gleichgewichtszusammensetzung der beteiligten Konformere bei verschiedenen Temperaturen ändert, ist in diesem Fall auch die Kopplungskonstante temperaturabhängig.¹¹

Eine parametrisierungsfreie Methode zur Bestimmung von Winkeln zwischen Bindungen stellt die kreuzkorrelierte Relaxation (*Cross Correlated Relaxation, CCR*) dar.⁴⁹ Da eine Isotopenmarkierung der Substanz⁵⁰ notwendig ist, wird diese Methode in der organischen Strukturbestimmung aber kaum angewendet. Da diese Methode in der Arbeit nicht angewendet wird, soll es hier bei der Erwähnung bleiben.

Die räumlichen Distanzinformationen zwischen den Atomen in organischen Molekülen und auch Biomolekülen werden experimentell meist über den homonuklearen (Proton-Proton) NOE-Effekt^{12,51,52,53} bestimmt. Anhand eines isolierten Zweispinsystems mit den Kernen I und S (Kernspin $\frac{1}{2}$) soll das Prinzip kurz erläutert werden. Wichtig für die Beobachtbarkeit der NOEs sind ausschließlich die Nullquanten (ZQ) und Doppelquanten-(DQ)-Relaxationsraten (W_0 und W_2) und deren Übergangsraten (siehe Abbildung 6). Den Zusammenhang zwischen diesen beiden Übergängen beschreibt die Kreuzrelaxationsrate, die durch das Symbol σ beschrieben wird. Die Singlequanten-(SQ)-Relaxationsraten beschreiben einen konkurrierenden Relaxationspfad.

$$\sigma_{IS} = W_{2IS} - W_{0IS}$$

Formel 3

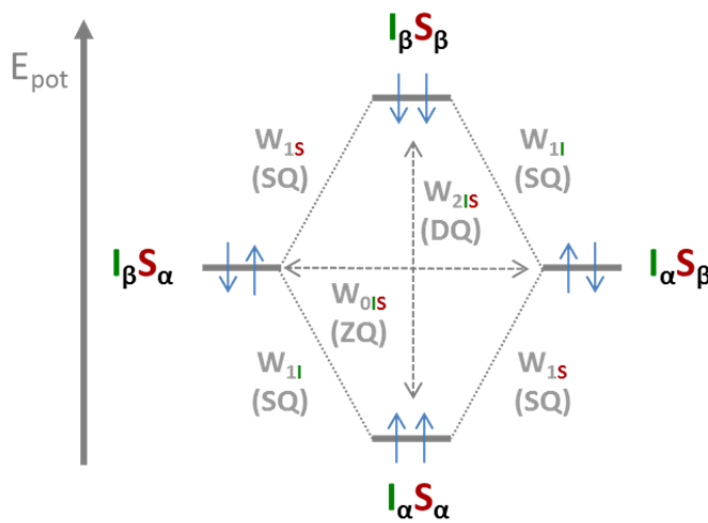


Abbildung 6: Energiediagramm für ein Zweispinsystem (Kernspin $\frac{1}{2}$), nach Neuhaus.¹² Gezeigt werden die Spinzustände und deren Übergänge.

Mathematisch können die relevanten Relaxationsraten der W_0 - und W_2 - Übergänge folgendermaßen beschrieben werden.¹²

$$W_{0IS} = \frac{1}{10} \times \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \times \left(\frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{IS}^6}\right) \times \frac{\tau_C}{1 + (\omega_I - \omega_S)^2 \tau_C^2}$$

Formel 4

$$W_{2IS} = \frac{3}{5} \times \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \times \left(\frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{IS}^6}\right) \times \frac{\tau_C}{1 + (\omega_I + \omega_S)^2 \tau_C^2}$$

Formel 5

Hierbei entsprechen γ_{IS} den gyromagnetischen Verhältnissen der entsprechenden Kerne, \hbar ist das Plancksche Wirkungsquantum geteilt durch 2π , τ_C ist die Korrelationszeit des Moleküls, r_{IS} der Abstand und ω_{IS} die Larmorfrequenzen der beiden Kernspins. Aus den beiden Gleichungen wird ersichtlich, dass die Raten der Null- und Doppelquantenübergänge sowohl vom Abstand der beiden Kernspins I

und S, als auch von deren Korrelationszeiten τ_C abhängig sind. Daher haben diese Größen auch direkten Einfluss auf die Intensität der im Experiment beobachteten NOE-Verstärkungen η .

$$\eta_{\max(\omega\tau_C \ll 1)} = \frac{W_{2IS} - W_{0IS}}{W_{0IS} + 2W_{1IS} + W_{2IS}} \quad \text{Formel 6}$$

mit

$$W_{1I} = \frac{3}{20} \times \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \times \left(\frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{IS}^6}\right) \times \frac{\tau_C}{1 + \omega I^2 \tau_C^2} \quad \text{Formel 7}$$

bzw.

$$W_{1S} = \frac{3}{20} \times \left(\frac{\mu_0}{4\pi}\right)^2 \times \left(\frac{\gamma_I^2 \gamma_S^2 \hbar^2}{r_{IS}^6}\right) \times \frac{\tau_C}{1 + \omega S^2 \tau_C^2} \quad \text{Formel 8}$$

Bei kleinen Molekülen mit sehr schnellen Korrelationszeiten in einem nicht-viskosen Lösungsmittel wird die NOE-Intensität maximal. Bei größeren Molekülen oder auch sehr viskosen Lösungsmitteln kann die NOE-Verstärkung einen Nulldurchgang erfahren. Hier können keine NOE-Signale beobachtet werden. Bei sehr langsamen Korrelationszeiten wird die NOE-Verstärkung negativ (siehe Abbildung 7, roter Kurvenverlauf).

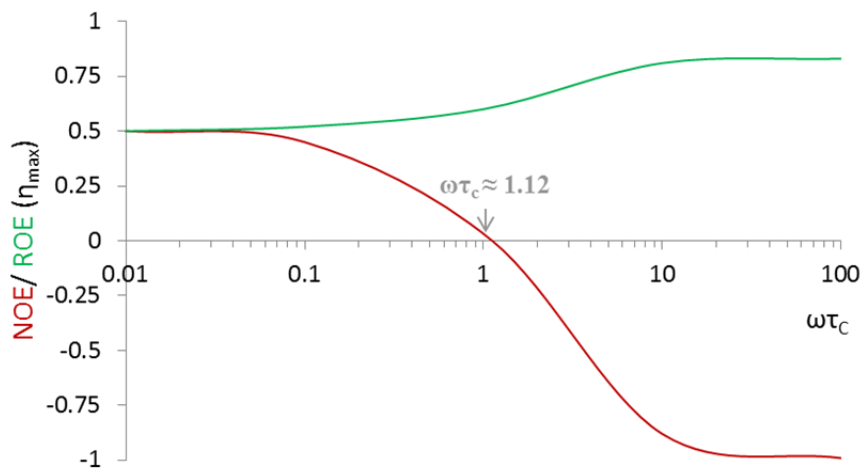


Abbildung 7: Abhängigkeit der maximalen NOE-Verstärkung (roter Kurvenverlauf) von der Korrelationszeit $\omega\tau_C$ in logarithmischer Auftragung. Bei $\omega\tau_C \approx 1.12$ ist die NOE-Verstärkung Null, hier wird meist das ROESY-Experiment verwendet, da der ROE immer positiv ist (grüner Kurvenverlauf).

Als NMR-Messtechnik wird meist das zweidimensionale NOESY^{54,55} (*Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY*) oder das ROESY³⁵ (*Rotating-frame Overhauser Effect SpectroscopY*) Experiment verwendet. Beide Experimente stehen auch als eindimensionale Varianten zur Verfügung. Das ROESY-Experiment ist besonders für Moleküle mit einer Molekülbeweglichkeit in Lösung von $\omega\tau_c=1$ geeignet (mit $\omega = \gamma B$). In diesem Fall ist der NOE wie beschrieben annähernd Null und somit im NOESY nicht beobachtbar, während der rotating-frame-NOE (= ROE) im ROESY immer positiv und somit bestimmbar ist (siehe auch Abbildung 7). Nachteilig ist jedoch, dass im ROESY-Experiment störende COSY- und TOCSY-Peaks auftauchen können. Diese Artefakte können durch die Verwendung des neueren EASY-ROESY-Experimentes minimiert, manchmal auch ganz unterdrückt werden.⁵⁶

Wie schon erwähnt zeigen die Kreuzsignale in den zweidimensionalen NOESY- und ROESY-Spektren die räumliche Nachbarschaft von Kernen an. Allgemein implizieren intensive Kreuzsignale kurze Protonenabstände und schwache Kreuzsignale entsprechend lange Protonenabstände. Diese eher qualitativen Informationen können als zusätzliche Parameter bei der Konstitutionsermittlung oder auch bei der Bestimmung der relativen Konfiguration hilfreich sein. Bei der Ermittlung von komplexeren dreidimensionalen Molekülstrukturen müssen jedoch die Intensitäten der Kreuzsignale quantitativ bestimmt werden, um sie dann in präzise Abstandsinformationen umrechnen zu können.

Bei der semi-quantitativen NOE-Methode werden, unter Annahme der Gültigkeit der *initial-rate-approximation*¹², die Intensitäten der Peaks aus einem zweidimensionalen Spektrum bei kurzer Mischzeit ermittelt. Für die Berechnung der unbekannten Distanzen ist eine Kalibrierung über einen definierten Referenzabstand notwendig. Als Kalibrierung eignet sich zum Beispiel der Abstand NH-H7 im Indol-Ring vom Tryptophan (282 pm) oder auch der Abstand zwischen zwei diastereotopen Protonen (178 pm). Die gesuchten unbekannten Distanzen zwischen räumlich benachbarten Kernspins können dann unter Berücksichtigung der r^{-6} -Referenzierung über einfachen Dreisatz berechnet werden.

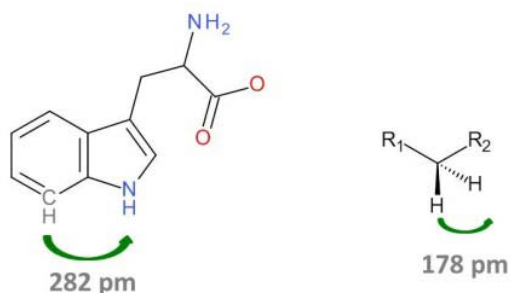


Abbildung 8: Häufig verwendete Kalibrierungsabstände bei der semi-quantitativen NOE-Bestimmung.

$$r_{IS} = r_{Referenz} \left(\frac{I_{IS}}{I_{Referenz}} \right)^{-\frac{1}{6}} \quad \text{Formel 9}$$

Diese semi-quantitative Analyse enthält jedoch einige methodische Fehlerquellen, (u.a. zusätzliche Relaxationspfade, Spindiffusion (multiple Spineffekte), selektiver Polarisationstransfer von inhomogener Inversion, unterschiedliche Molekülkorrelationszeiten τ_c zwischen den Spins, Ungenauigkeiten bei der Signalintegration, konformationelle Flexibilität, ...) ¹² die durch Angabe eines entsprechend großen Fehlertoleranzbereichs bei den berechneten Distanzen kompensiert werden

sollten. Bei der konformationellen Analyse von Biomolekülen funktioniert dieser semi-quantitative NOE-Ansatz aufgrund der großen Anzahl von NOE-Kontakten häufig sehr gut und wird daher auch routinemäßig verwendet. Für viele strukturelle Fragestellungen bei kleinen Molekülen mit nur wenigen NOE-Kontakten sind diese semi-quantitativ bestimmten Distanzen aber häufig zu ungenau um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Für die Bestimmung von präziseren quantitativen Proton-Proton Abständen in Molekülen hat sich der PANIC-Ansatz⁵⁷ (*Peak Amplitude Normalization for Improved Cross-relaxation*) bewährt. Durch die Normalisierung der NOE- bzw. ROE-Signale (Intensitäten) durch Division mit den Diagonalsignalen werden nicht erwünschte Relaxationseffekte weitestgehend eliminiert und somit der Gültigkeitsbereich der *initial-rate-approximation*⁵⁸ auch auf größere Mischzeiten (τ_m bis ca. 500 ms) ausgedehnt. KRISHNAMURTHY⁵⁹ erweiterte die Anwendbarkeit der Methode auch auf die eindimensionalen NOESY bzw. ROESY-Experimente. Die Kombination der PANIC-Methode mit neuen NMR-Experimenten wie das eindimensionale DPFGSE (*Double-Pulsed-Field-Gradient Spin-Echo*)^{60,61}, mit selektiver Protonenanregung und gleichzeitiger Eliminierung störender anti-Phasen Anteile, ermöglicht die Bestimmung von genauen Abständen zwischen den Kernspins, die sowohl bei der Bestimmung der Relativkonfiguration von starren als auch flexiblen Molekülen einen wesentlichen Beitrag leisten können.^{62,63}

Bei der NOE-Analyse von kleinen flexiblen Molekülen und Peptiden mit unterschiedlichen Konformationen, die sich in Bezug auf die NMR-Zeitskala schnell ineinander umwandeln, werden methodenbedingt Ensemble-gewichtete NOE-Kontakte bestimmt. Ein Ansatz um solche Ensemblepopulationen mit den gemittelten NOEs bestimmen zu können ist die Annahme, dass die Moleküle eine eindeutige Anzahl an low-energy-Konformationen in Lösung einnehmen und das Molekül sich instantan in die anderen Konformationen umwandelt (*discrete-jumps*). Die gemittelten NOE-Distanzen können dann zusammen mit berechneten und energieminierten Molekülgeometrien verwendet werden, um die Konformerpopulation zu bestimmen⁶⁴ (z. B. mit der Software WEEDHEAD (*WEEDHEAD Examines Experimental Distance Heretics from Ensemble Averaged Distances*)).⁶⁵

Der Vollständigkeit wegen sei hier noch auf das EXSY-Experiment (*EXchange Spectroscopy*)^{66,67} hingewiesen mit dem dynamische Prozesse im Molekül auf der Zeitskala des NMR-Experiments verfolgt werden können. Die Pulssequenz des Experiments ist identisch mit der des zweidimensionalen NOESY- bzw. eindimensionalen NOE-Experiments. Da eine derartige Problemstellung in der Arbeit nicht auftrat, soll es hier bei der Erwähnung bleiben.

Auf Grundlage der hier kurz beschriebenen NMR-Experimenten und Methoden können sehr viele strukturelle Fragestellungen von kleinen Molekülen und Peptiden in Lösung bereits beantwortet werden. Gelingt dies nicht, können die RDCs als komplementärer Parameter verwendet werden. Deren Anwendung in der Strukturanalyse wird im nächsten Kapitel beschrieben.

3.2. Residuale Dipolare Kopplungen (RDCs) in der Strukturanalyse

3.2.1. Theoretische Aspekte

In der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist die dipolare Kopplung D , neben der quadrupolaren Kopplung, die nur bei Kernen mit einer nicht-sphärischen Ladungsverteilung im Atomkern auftritt (Kernspinquantenzahl $I > \frac{1}{2}$), und der Anisotropie der chemischen Verschiebung (nicht-kugelsymmetrische Elektronendichteverteilung), die dominierende Interaktion der Kernspins untereinander. In der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie ist die dipolare Kopplung aufgrund der schnellen Umorientierung der Moleküle in Lösung nicht direkt zu beobachten. Hier dominiert die Kopplung über Bindungen (skalare J-Kopplung). Um den vollen Informationsgehalt der dipolaren Kopplungen dennoch in der Flüssigkeits-NMR-Spektroskopie nutzen zu können, muss der zu untersuchende Analyt eine schwache Vorzugsrichtung zum externen Magnetfeld einnehmen. In diesem Fall kann die dipolare Kopplung als zusätzlicher Beitrag zur isotropen skalaren-Kopplung aus den Spektren entnommen werden. Die Auswertung erfolgt meist über den Alignment-Tensor-Ansatz¹⁴, dessen theoretisches Konzept im Weiteren kurz erläutert wird.

Die Wechselwirkungen von Kernspins mit äußeren und lokalen Magnetfeldern können quantenmechanisch mit dem Hamilton-Operator beschrieben werden. Für die direkte Dipol-Dipol Kopplung zweier isolierter Kernspins \hat{I}_I und \hat{I}_S (im statischen Fall (Festkörper)) nimmt der Hamilton-Operator folgende Form an.⁶⁸

$$\hat{H}_{IS}^{DD} = b_{IS}(3(\hat{I}_I \vec{e}_{IS})(\hat{I}_S \vec{e}_{IS}) - \hat{I}_I \hat{I}_S) \quad \text{Formel 10}$$

mit

$$b_{IS} = -\frac{\hbar\mu_0}{4\pi} \gamma_I \gamma_S \frac{1}{r_{IS}^3} \quad \text{Formel 11}$$

Dabei ist \vec{e}_{IS} der internukleare Einheitsvektor zwischen den betrachteten Kernspins \hat{I}_I und \hat{I}_S und b_{IS} entspricht der maximalen dipolaren Wechselwirkung, die vom Abstand der Kernspins r_{IS} , den gyromagnetischen Verhältnissen γ und der magnetischen Feldkonstante μ_0 abhängig ist. Für die Beobachtung des NMR-Signals ist nur der säkulare Anteil der dipolaren Wechselwirkung notwendig, also die Terme, die mit dem Zeeman-Hamiltonoperator wechselwirken. Für homonukleare dipolare Spin-Spin-Kopplungen nimmt der Hamilton-Operator die folgende Form an.

$$\hat{H}_{IS}^{DD} = D_{IS}(3\hat{I}_I^Z \hat{I}_S^Z - \hat{I}_I \hat{I}_S) \quad \text{Formel 12}$$

Im heteronuklearen Fall vereinfacht sich der Hamilton-Operator zu

$$\hat{H}_{IS}^{DD} = D_{IS}(2\hat{I}_I^Z \hat{I}_S^Z) \quad \text{Formel 13}$$

Sowohl im heteronuklearen als auch im homonuklearen Fall ist die im NMR-Experiment beobachtbare säkulare Dipol-Dipol-Kopplung gegeben durch

$$D_{IS} = \frac{b_{IS}}{2\pi} \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} = -\frac{\hbar\mu_0}{8\pi^2} \gamma_I \gamma_S \frac{1}{r_{IS}^3} \frac{3\cos^2\theta - 1}{2} \quad \text{Formel 14}$$

Dabei beschreibt θ den Winkel zwischen dem äußeren Magnetfeld B_0 (z^L) und dem Kernspinvektor I und S. Die Größenordnung der dipolaren Kopplung ist also nur von der Distanz zwischen den beiden Kernspins I und S, dem Winkel θ und den angegebenen Naturkonstanten abhängig. Dabei sei hier noch informierend darauf hingewiesen, dass die säkulare Dipol-Dipol-Kopplung gleich 0 ist, wenn der Term $3\cos^2\theta - 1 = 0$ ist. Dies ist beim magischen Winkel (54.74°) der Fall.⁶⁸

$$\theta_{magic} = \arctan\sqrt{2} \cong 54.74^\circ \quad \text{Formel 15}$$

Bei diesem Winkel mitteln sich alle anisotropen Wechselwirkungen zu Null, wenn die Probe während der Messung schnell rotiert wird (*Magic-Angle-Spinning, MAS*).⁶⁹ An dieser Stelle erkennt man bereits, dass im Vergleich zur NOE-Verstärkung, wo die Kernspindistanzen IS vom Faktor r^{-6} abhängig sind, die dipolaren Kopplungen mit dem Faktor r^{-3} weitreichender sind und zusätzlich noch wertvolle Orientierungsinformationen über den Winkel θ zwischen B_0 und r_{IS} beinhalten.

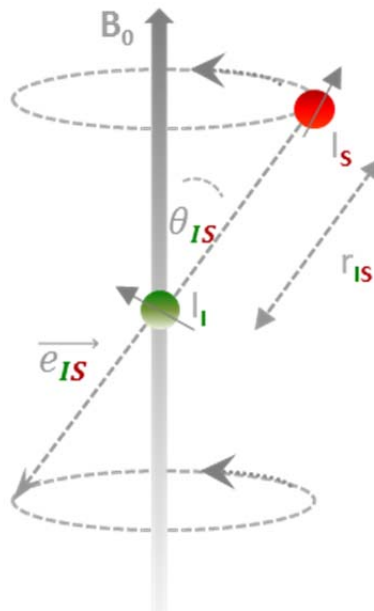


Abbildung 9 : Zweidimensionale Vektordarstellung des Winkels θ_{IS} zwischen dem Magnetfeld B_0 und den beiden Kernspins I und S, wobei \vec{e}_{IS} dem Einheitsvektor entspricht. Für eine einzelne dipolare Kopplung D_{IS} kann der Kernspinvektor sowohl in die Richtung (+z) des oberen als auch in die Richtung des unteren Kegels (-z) zeigen. In der x und y Ebene kann der Kernspinvektor jegliche Orientierung annehmen, dies wird durch die beiden Kegel gezeigt. Eine einzelne dipolare Kopplung kodiert also ein Kontinuum an Orientierungen.^{70,71}

Betrachtet man nun die beiden Kernspins I und S, im folgendem ausgedrückt durch den Kernspinvektor \vec{R}_{IS} ($= \vec{e}_{IS} * r_{IS}$), als Teil eines Moleküls in Lösung, so zeigt der magnetische Feldvektor \vec{B} im Laborkoordinatensystem konstant in Richtung z^L , während \vec{R}_{IS} nun aufgrund der Molekülbeweglichkeit zeitabhängig ist. Der Term $\cos \theta$ und somit auch die dipolare Kopplung D_{IS} sind nun ebenfalls zeitlich gemittelt ($\langle \cos \theta \rangle$). Folglich hängt die Größenordnung von D_{IS} von der durchschnittlichen Orientierung des gesamten Moleküls im Alignment-Medium ab. Die zeitliche Mittelung des Kosinusters wird durch die eckigen Klammern ausgedrückt. Unter schwachen Alignment-Bedingungen spricht man dann häufig nicht mehr von der dipolaren Kopplung sondern von der residualen dipolaren Kopplung (*Residual Dipolar Coupling*, RDC).

$$RDC_{IS} = -\frac{\hbar\mu_0}{8\pi^2} \gamma_I \gamma_S \frac{1}{r_{IS}^3} \frac{\langle 3\cos^2\theta - 1 \rangle}{2} \quad \text{Formel 16}$$

Folgend der Darstellung von KRAMER¹⁴ (siehe Abbildung 10) kann man das Laborkoordinatensystem, in dem das Molekül frei drehbar ist, in ein molekülfestes Koordinatensystem (x, y, z) transformieren. Somit sind die Atomabstände und Winkel im Molekül \vec{R}_{IS} konstant und das Magnetfeld \vec{B} zeitlich gemittelt ($B_{0(t)}$). Der Kosinusterm in der Gleichung kann daher durch den Wahrscheinlichkeitstensor **P** beschrieben werden.

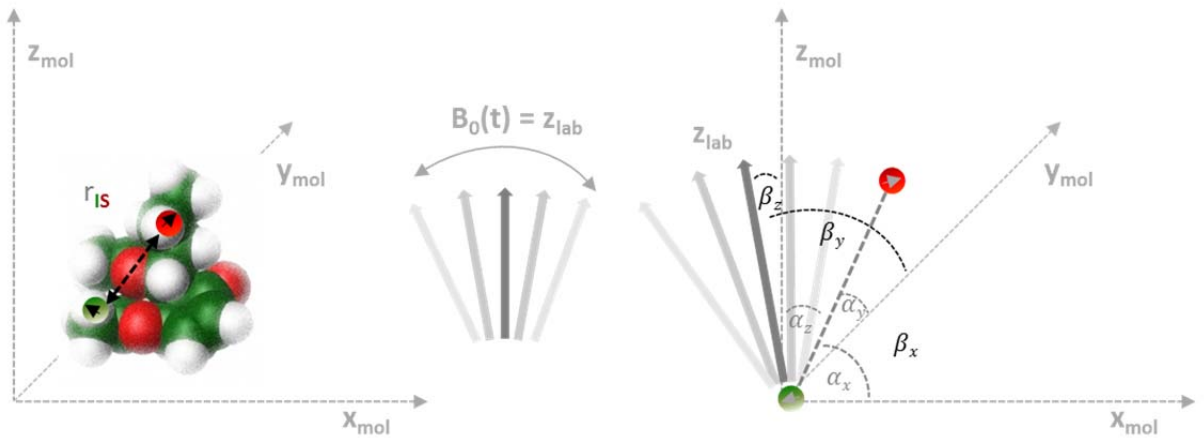


Abbildung 10: Transformation vom Laborkoordinatensystem in dem das Molekül rotiert ($\theta(t)$) in ein molekülfestes Koordinatensystem ($B_0(t)$). Die Winkel α_x , α_y und α_z sind nun fixiert und durch die Molekülgeometrie vorgegeben. Die Winkel β_x , β_y und β_z zum Magnetfeld sind nun variabel und zeitlich gemittelt.

Die Hauptachsenwerte $P_{\tilde{x}}$, $P_{\tilde{y}}$ und $P_{\tilde{z}}$ des Wahrscheinlichkeitstensors **P** geben die Wahrscheinlichkeit an, das Magnetfeld \vec{B} auf der entsprechenden Achse des molekülfesten Koordinatensystems vorzufinden. Die Summe der Hauptachsenwerte ist 1, d.h. für den isotropen Fall bei freier Molekülbeweglichkeit ist $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = P_{\tilde{z}} = \frac{1}{3}$, der Ellipsoid ist zu einer Kugel geworden. Dementsprechend gilt für den starren Fall $P_{\tilde{x}} = P_{\tilde{y}} = 0$ und $P_{\tilde{z}} = 1$ und der Ellipsoid kollabiert zu einer einzelnen Linie die in Z-Richtung zeigt. Kennt man die drei Distanzkomponenten r_x , r_y , r_z der Kernspinvektoren, kann der zeitlich gemittelte Kosinusterm durch folgende Gleichung beschrieben werden.

$$\langle \cos^2 \theta \rangle = P_{\tilde{x}} r_{\tilde{x}}^2 + P_{\tilde{y}} r_{\tilde{y}}^2 + P_{\tilde{z}} r_{\tilde{z}}^2 \quad \text{Formel 17}$$

Setzt man diesen Ausdruck in Formel 16 ein, können prinzipiell von jedem Kernspin Paar die RDCs berechnet werden, wenn die Orientierung und die Achsenwerte des Tensors **P** bekannt sind. In der Praxis wird aber meist nicht der Wahrscheinlichkeitstensor **P**, sondern der spurlose Alignment-Tensor **A** oder auch der Saupe-Tensor **S**^{17,18} verwendet. Der Alignment-Tensor **A** ist wie folgt mit dem Wahrscheinlichkeitstensor **P** verknüpft.

$$A = P - \frac{1}{3} \mathbf{1}. \quad \text{Formel 18}$$

1 entspricht dabei dem Einheitstensor. Im Hauptachsensystem des Alignment-Tensors **A** wird die mittlere Orientierung eines Kernspinpaares in Bezug auf das äußere Magnetfeld analog zu **P** beschrieben.

$$\langle \cos^2 \theta - \frac{1}{3} \rangle = A_{\tilde{x}} r_{\tilde{x}}^2 + A_{\tilde{y}} r_{\tilde{y}}^2 + A_{\tilde{z}} r_{\tilde{z}}^2 \quad \text{Formel 19}$$

mit

$$A_{\tilde{x}} = P_{\tilde{x}} - \frac{1}{3}, A_{\tilde{y}} = P_{\tilde{y}} - \frac{1}{3}, A_{\tilde{z}} = P_{\tilde{z}} - \frac{1}{3} \quad \text{Formel 20}$$

Setzt man wiederum diesen Ausdruck in die RDC-Formel 16 ein, so können auch hier für jedes beliebige Spin-Paar die RDCs berechnet werden, wenn Orientierung und Achsenwerte des Alignment-Tensor **A** bekannt sind.

$$RDC_{IS} = \frac{3}{2} b_{IS} (A_{\tilde{x}} r_{\tilde{x}}^2 + A_{\tilde{y}} r_{\tilde{y}}^2 + A_{\tilde{z}} r_{\tilde{z}}^2) \quad \text{Formel 21}$$

Der Alignment-Tensor **A** ist eine reelle spurlose (3x3) Matrix und wird von fünf unabhängigen Elementen bestimmt. Daher müssen mindestens fünf linear unabhängige RDCs experimentell bestimmt werden, um das lineare Gleichungssystem eindeutig mathematisch lösen zu können. Wie aus der RDC-Gleichung ersichtlich ist, werden neben den experimentellen RDCs (RDC_{exp}) noch die Bindungslängen *r* (z.B. C-H, N-H) mit den zugehörigen Raumkoordinaten zwischen den entsprechenden Kernspins benötigt. Diese können durch einen Strukturvorschlag (z.B. als PDB, XYZ, oder Mol-file) bereitgestellt werden. Mit diesen Informationen kann der Alignment-Tensor mathematisch exakt bestimmt werden.^{14,72} Stehen mehr als fünf experimentelle RDCs aus den Spektren zur Verfügung, können daraus Strukturinformationen gewonnen werden. Das aus den zusätzlichen eingebrachten RDCs resultierende überbestimmte Gleichungssystem kann mit Hilfe der Singulärwertzerlegung (*Singular-Value-Decomposition, SVD*) gelöst werden. Als Ergebnis erhält man die Alignment-Tensor-Elemente, d. h. dessen Eigenwerte, Eulerwinkel und Tensorkomponenten,

sowie Gütekriterien mit denen die Lösbarkeit des Gleichungssystems beurteilt werden kann. Die wichtigsten Komponenten sind in der angefügten Tabelle erläutert.

Tabelle 1: Übersicht und Beschreibung der wichtigsten Alignment-Tensorkomponenten bei der RDC-Analyse.

Tensorkomponente	Informationsgehalt
Eulerwinkel	Orientierung der Hauptachsen des Tensors im Laborkoordinatensystem (lab-frame), Die Z-Achse zeigt per Konvention in die Richtung des statischen Magnetfeldes B_0 .
Eigenwerte	Beschreiben die Stärke der Orientierung in Bezug auf die Hauptachsen des Tensors P bzw. A. ($P_{\tilde{x}}, P_{\tilde{y}}, P_{\tilde{z}}$ bzw. $A_{\tilde{x}}, A_{\tilde{y}}, A_{\tilde{z}}$).
Axiale Komponente A_a	$A_a = \frac{A_{\tilde{z}}}{2}$, ist ein Maß für die Stärke des Alignments, \tilde{z} -Komponente des Wahrscheinlichkeits- bzw. Alignment Tensors.
Rhombische Komponente A_r	Beschrieben durch $A_r = \frac{(A_{\tilde{x}} - A_{\tilde{y}})}{3}$, \tilde{x} bzw. \tilde{y} -Komponente des Wahrscheinlichkeits- bzw. Alignment Tensors.
Generalisierter Ordnungsparameter ϑ (generalized degree of order, GDO)	Beschrieben durch $\vartheta = \sqrt{\frac{2}{3} \sum_{a,b \in [x,y,z]} A_{ab}^2}$, gibt die mittlere Stärke der Orientierung an.

Neben den Tensorkomponenten erhält man die aus dem Alignment-Tensor rückgerechneten theoretischen RDCs (RDC_{calc}), die für das jeweils bestimmte Gleichungssystems die beste Lösung repräsentieren. Je besser die RDC_{exp} mit den RDC_{calc} übereinstimmen, desto besser ist der Strukturvorschlag. Um die Güte der berechneten RDC_{calc} numerisch zu beschreiben, können Faktoren wie die mittlere quadratische Abweichung (**Root-Mean-Square-Deviation**, *RMSD*) oder normierte Varianten, wie zum Beispiel der Q-Faktor⁷³ oder auch der Pearsson'sche Korrelationskoeffizient R herangezogen werden.

$$RMSD_{RDC} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_i (D_{i,exp} - D_{i,calc})^2} [Hz] \quad \text{Formel 22}$$

$$Q = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_i (D_{i,exp} - D_{i,calc})^2}}{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_i D_{i,exp}^2}} \quad \text{Formel 23}$$

$$R = \frac{\sum_{i=1}^n (D_{exp,i} - \overline{D_{exp}})(D_{calc,i} - \overline{D_{calc}})}{\sqrt{\sum_i (D_{exp,i} - \overline{D_{exp}})^2} \sqrt{\sum_i (D_{calc,i} - \overline{D_{calc}})^2}} \quad \text{Formel 24}$$

Heutzutage stehen eine Vielzahl von Computerprogrammen^{74,75,76,77,78,79} zur Verfügung, um die beschriebenen RDC-Berechnungen mit Ausgabe der entsprechenden Qualitätskriterien schnell und

einfach durchführen zu können. Da in dieser Arbeit vor allem die Software von SCHMIDTS (*RDC@hotFCHT*)^{78,79} verwendet wurde, sind die Beschriftungen in der Abbildung 11 und Abbildung 12 spezifisch an diese Software angelehnt. Das in der unteren Abbildung 11 gezeigte Programmschema eignet sich hervorragend um eine starre Molekülgeometrie mit einer Vorzugskonformation gesamtheitlich mit Hilfe der RDC-Analyse zu bewerten. Es werden die experimentellen RDCs an einen Strukturvorschlag über einen Alignment-Tensor angepasst und anschließend aufgrund der Qualitätskoeffizienten beurteilt, ob die experimentellen Daten durch den Strukturvorschlag gut beschrieben werden. Daher wird diese Methode in *RDC@hotFCHT* auch als *Single-Conformer-Single-Tensor fit* (SCST) bezeichnet. Sind mehr als fünf experimentelle RDCs verfügbar, können auch Kopplungen über den vorher bestimmten Alignment-Tensor vorausgesagt werden. Dies kann sowohl als Gütekontrolle des Tensors, aber auch zum Abgleich experimenteller RDC-Werte verwendet werden.

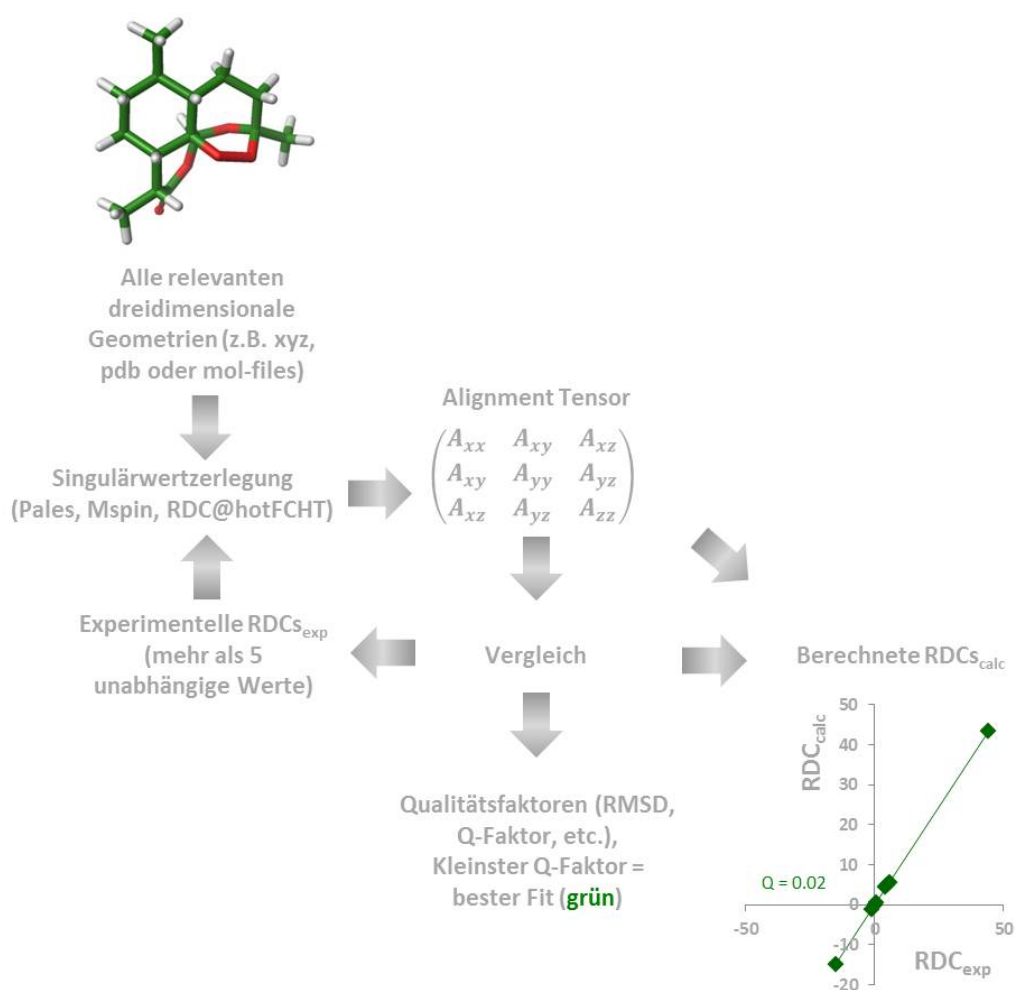


Abbildung 11: Schematische Darstellung der SCST-Methode. Mit der Bereitstellung eines Strukturmodells (hier als Beispiel Artemisinin) und den experimentellen RDCs wird mit Hilfe der SVD der Alignment-Tensor berechnet. Die aus dem Tensor rückberechneten RDCs können dann in einem Korrelationsdiagramm mit den experimentellen RDCs verglichen werden. Zusammen mit den berechneten Qualitätsfaktoren ergibt sich dann meist ein eindeutiges Bild, ob der Strukturvorschlag zu den ermittelten experimentellen Daten passt.

Bei flexiblen Molekülen, die intramolekulare Bewegungen aufweisen, wird die Analyse schwieriger, weil zwei Mittelungsprozesse gleichzeitig ablaufen (falls keine überwiegend populierte Vorzugskonformation vorliegt). Zum einen die Molekülrotation als Ganzes, wie auch bei den starren Molekülen, zum anderen der Mittelungsprozess aufgrund der intramolekularen Bewegungen. Auf der NMR-Zeitskala führt dies zu einer Mittelung der Distanzen und Winkeln und deshalb auch zur Mittelung der RDCs. Eine häufig angewendete Methode, um Strukturaussagen für flexible Moleküle mit der zuvor beschriebenen Vorgehensweise erhalten zu können, ist die Verwendung eines Ensembles mit mehreren Konformeren als Strukturvorschlag für die Bestimmung des Alignment-Tensors. Die einzelnen Konformere können dann entweder mit je einem eigenem Alignment-Tensor versehen werden, man spricht dann vom **Multi-Conformer-Multi-Tensor-fit-Ansatz (MCMT)** oder alle Konformere werden durch einen einzigen Alignment-Tensor beschrieben, man spricht hier vom **Multi-Conformer-Single-Tensor-fit-Ansatz (MCST)**. Ein eher praktischer Nachteil beim MCMT-Fit Ansatz ist die große Anzahl an benötigten RDCs, da für jeden angenommenen Tensor mindestens 5 RDCs benötigt werden, wobei für den MCST-fit Ansatz, ähnlich wie bei der Tensorbestimmung mit starren Molekülen, lediglich 5 RDCs benötigt werden. Dies ist vor allem ein Nachteil bei der Analyse von kleinen Molekülen. Daher gibt es für den MCMT-fit Ansatz auch nur wenige literaturbeschriebene Beispiele.^{192,195} Ein Kriterium, ob nun mit dem MCST- oder dem MCMT-Ansatz bei flexiblen Molekülen gearbeitet werden kann, ist die Lebensdauer der Konformere. Ist die intramolekulare Umwandlung bezüglich der NMR-Zeitskala langsam, d.h. die Lebensdauer der einzelnen Konformere groß, sollte jedes Konformer mit einem eigenen Alignment-Tensor (MCMT) beschrieben werden. Bei schneller Umwandlung der Konformere bezüglich der Molekülorientierung genügt meist ein Alignment-Tensor um das Konformerensemble darzustellen. Welcher Ansatz aber per se unter bestimmten Bedingungen der geeignete ist, muss letztendlich von Fall zu Fall entschieden werden.^{80,81} In der Realität ist aufgrund der geringen Zahl bestimmbarer RDCs jedoch meist nur der MCST möglich. In beiden beschriebenen Methoden (MCST und MCMT) erfolgt die Anpassung der RDCs durch eine Permutierung der Konformerpopulation. Die Ensemblepopulation mit den besten Qualitätsfaktoren kann meist als die korrekte angesehen werden.

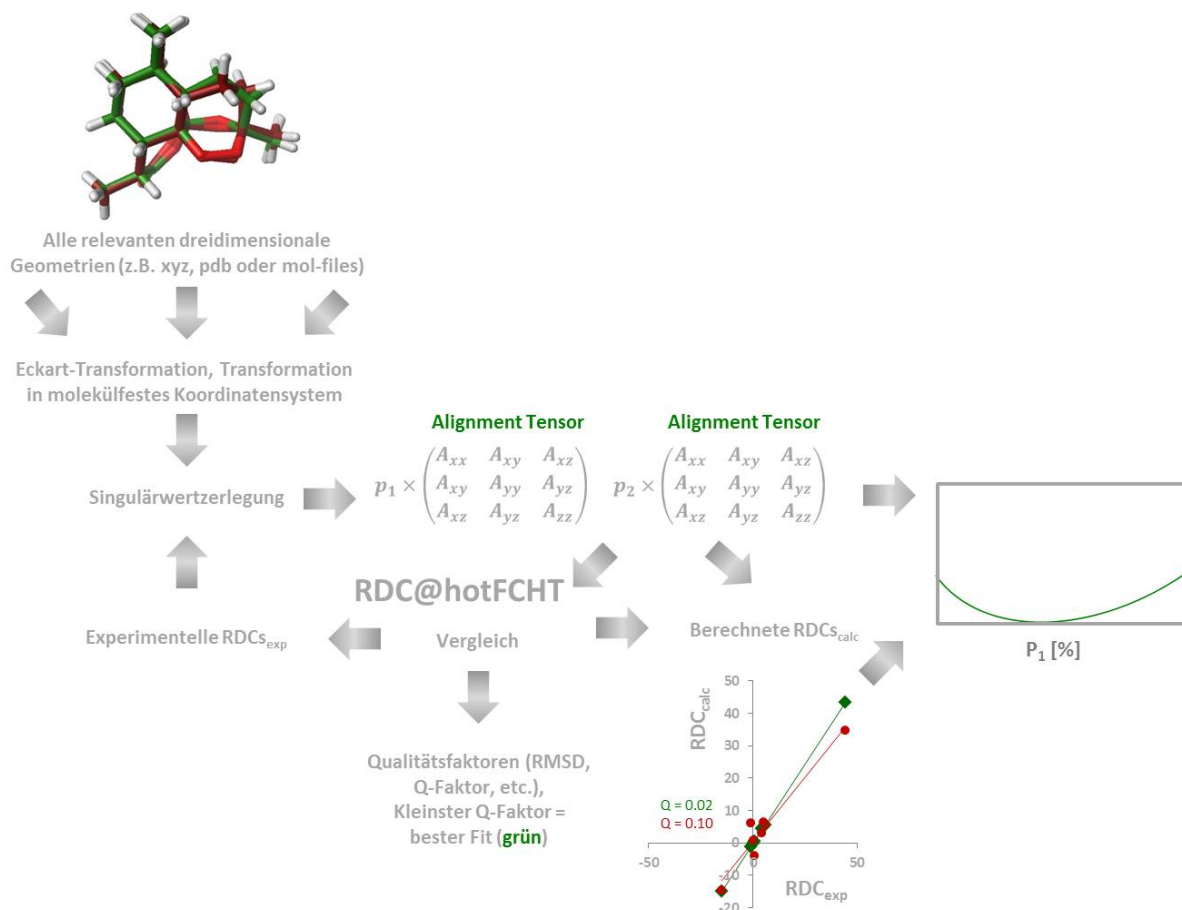


Abbildung 12: Schematische Darstellung der RDC-Auswertung in flexiblen Molekülen (hier im Beispiel: 2 Konformere, rot und grün) nach der MCST-Methode. Die Koordinaten der verschiedenen Konformeren werden durch die ECKART-Transformation⁸² in ein gemeinsames Koordinatensystem überführt. Die Anpassung der experimentellen RDCs wird durch eine Permutierung der Konformerenpopulation (p_1 , p_2) durchgeführt. Das Konformerensemble mit den besten Übereinstimmungen (siehe grünes Kurvenminimum im Diagramm, $p_2 = 1 - p_1$) bezüglich Qualitätsfaktoren wird als das korrekte angenommen.

3.2.2. Erzeugung von 3D-Strukturvorschlägen

Für die RDC-Analyse von kleinen Molekülen werden valide 3D-Strukturvorschläge benötigt, welche dann mit der entsprechenden Auswertesoftware (hier: RDC@hotFCHT)^{78,79} an die experimentellen RDCs angepasst werden, siehe dazu auch Kapitel 3.2.1, insbesondere Abbildung 11 und Abbildung 12. Die Strukturvorschläge können mit einer Vielzahl von sogenannten *in silico*-Methoden berechnet werden. Die Konzepte die in dieser Arbeit angewendet wurden, werden im Folgenden kurz vorgestellt.

In der Computer-Chemie gibt es eine Vielzahl von Methoden für die Berechnung von Molekülgeometrien und Molekülenergien. Diese Methoden lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe beinhaltet die quantenmechanischen Methoden (semi-empirisch, ab-initio, Dichtefunktionaltheorie⁸³ (*Density-Functional-Theory*, *DFT*)) welche explizit die Wechselwirkungen der Kerne und Elektronen berücksichtigen. Dies erfordert häufig lange Rechenzeiten, vor allem bei größeren Molekülen und/ oder langen Simulationszeiten. Eine einfachere und schnellere Alternative bilden die Kraftfeldmethoden (*Force-Field*, *FF*) da sie von einer klassischen Molekül-Mechanik-Beschreibung (*Molecular-Mechanics*, *MM*) ausgehen.⁸⁴ Die MM-Methoden behandeln Atome als Massepunkte (Kugeln), die durch Federn verbunden sind. Diese Annahme reduziert die Rechenzeit erheblich. In Abbildung 13 sind die Einzelkomponenten (Bindungslängen, Bindungswinkeln, Torsionswinkel, valenzunabhängige elektrostatische und van der Waals Wechselwirkungen) gezeigt, die bei der Kraftfeldanalyse berücksichtigt werden.

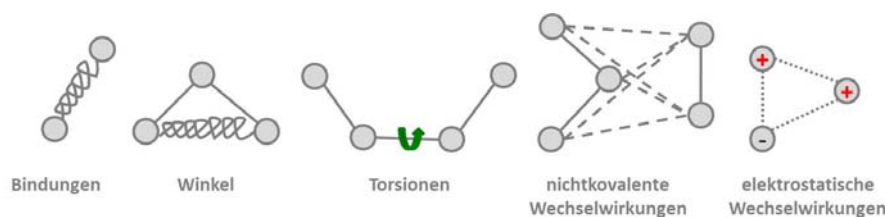


Abbildung 13: Darstellung der wichtigsten Einzelkomponenten die bei der Kraftfeldanalyse berücksichtigt werden. Aus der Summe der Einzelenergien ergibt sich die Gesamtenergie der untersuchten Struktur.

Die Summe der Teilenergien der in Abbildung 13 gezeigten Beiträge ergibt die Gesamtenergie der jeweils erzeugten Molekülgeometrie. Die Differenzen der Gesamtenergien der erzeugten Strukturen können zum Vergleich und Bewertung der Strukturen herangezogen werden. Im Gegensatz zu den berechneten Energien aus den quantenmechanischen Methoden sind diese hier aber keine absoluten Energien und dürfen daher nur zum Vergleich innerhalb der erzeugten Konformere bzw. Strukturen verwendet werden.

$$E_{tot}(\Delta H) = E_{Bindung} + E_{Winkel} + E_{Torsion} + E_{nichtkovalent\ WW} + E_{elektrostat.\ WW} \quad \text{Formel 25}$$

Für die Konformationssuche mit Kraftfeldern werden bei kleinen Molekülen und Peptiden häufig stochastische bzw. Monte-Carlo-Verfahren aber auch moleküldynamische-Verfahren (*Molecular-Dynamics*, *MD*) eingesetzt. Bei den stochastischen bzw. Monte-Carlo-Verfahren werden, ausgehend von einer energieminierten Startstruktur, willkürliche Änderungen von Atomkoordinaten und Torsionswinkel vorgenommen und dadurch eine neue Struktur erzeugt. Nach der anschließenden Energieminimierung wird die Struktur, falls sie den zuvor definierten Konvergenzkriterien entspricht,

ausgegeben. Die neu erzeugte Struktur dient anschließend als Startpunkt für den darauffolgenden Lauf. Im Gegensatz zu den stochastischen Verfahren simulieren die molekulardynamischen Verfahren unter Verwendung der Newton'schen Bewegungsgleichungen die zeitabhängigen Molekülbewegungen (Trajektorien) auf der Potentialhyperfläche, siehe auch Abbildung 14 rechts. Aufgrund des großen Rechenaufwandes sind aber die Simulationszeiten häufig auf wenige Piko- bzw. Nanosekunden begrenzt, wodurch meist nur das lokale Umfeld rund um die Startstruktur abgetastet wird. Welches Modellierungsverfahren genau und welche Kraftfelder konkret genutzt werden, hängt stark vom untersuchten Molekül und natürlich auch von der Fragestellung ab.⁸⁴

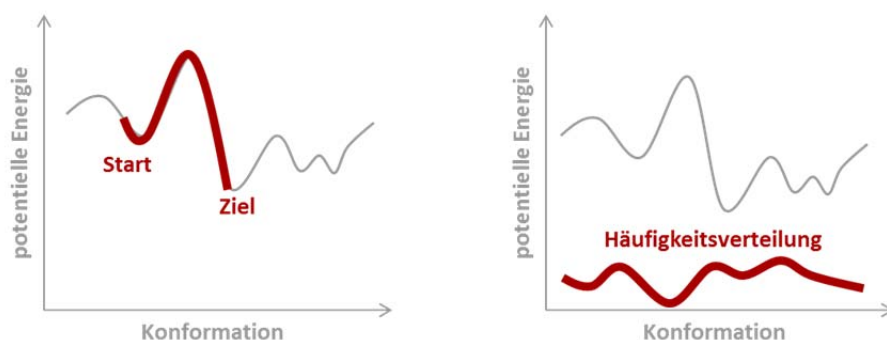


Abbildung 14: Potentielle Energie eines Moleküls (Ordinate) als Funktion seiner Konformation (Abszisse). Linke Abbildung: Aus der Startkonformation wird durch Anwendung von stochastischen bzw. Monte-Carlo-Verfahren-Verfahren und anschließender Energieminimierung die Zielstruktur erzeugt. Dieser Prozess wird mehrfach wiederholt, wobei die erzeugte Zielstruktur als Startstruktur im nachfolgenden Suchlauf dient. Rechte Abbildung: Die Molekulardynamik-Verfahren tasten den Konformationsraum auf der Potentialhyperfläche über einen gewissen Zeitraum selbstständig ab (üblicherweise im ps- oder ns-Bereich) und liefern somit die entsprechenden Konformationsverteilungen über den abgetasteten Zeitraum (Häufigkeitsverteilung).⁸⁴

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Molekülprojekte wurden unterschiedliche Methoden und Softwarepakete zur Strukturgenerierung verwendet, die hier kurz vorgestellt werden.

Die Strukturgenerierungen im Diacetylhydroporone A¹²-Projekt wurden zuerst mit konventionellen Kraftfeldmethoden, basierend auf dem Tripos 7.0-Kraftfeld, mit der Software SYBYL⁸⁵ durchgeführt. Anschließend wurden diese mit DFT-Methoden optimiert (Gaussian 03⁸⁶, B3LYP/6-311+G**) und die relativen Energien bestimmt.

Im Dithienylcyclopenten-Projekt wurde ebenso vorgegangen. Hierbei wurden zuerst Strukturen mit der Software Maestro-Schrödinger-Suite 2012⁸⁷ mit dem Kraftfeld OPLS_2005⁸⁸ (bzw. einige zuvor auch mit der Software SYBYL⁸⁵) erzeugt und nach der RDC-Analyse die bestätigten Strukturen mit DFT-Methoden optimiert (Gaussian 09⁸⁹, B3LYP/6-311+G(d,p)). Bei der Struktursuche mit der Maestro-Schrödinger-Suite 2012⁸⁷ wurde das conformational-search-Modul verwendet. Generelles Ziel dabei ist auch hier das Auffinden von möglichst vielen lokalen energetischen Minima eines Moleküls auf dessen Potentialfläche. Für die Generierung einer Kollektion von Konformeren mit der Software stehen die im Folgenden beschriebenen drei Methoden zur Verfügung. Alle drei Protokolle haben gemeinsam, dass die beim Suchlauf zuvor generierte Konformation als Startstruktur für den nachfolgenden Iterationsschritt verwendet wird.

Die Monte-Carlo-Multiple-Minimum (MCM) ist eine generelle Methode, die sowohl bei kleinen als auch bei größeren Strukturen verwendet werden kann. Dabei werden bei der Suche zufällige Änderungen in den Torsionswinkel durchgeführt. Sie ist sehr effizient bei der Abtastung von nahen

aber auch von entfernten Bereichen auf der Potentialfläche. Nachteilig ist die lange Rechenzeit, wenn bei der Suche mehr als 10 variable Torsionen erlaubt werden.

Ebenso wie die MCMM- können auch die Low-Mode- (LMOD) bzw. Large-scale-Low-Mode- (LLMOD) Methoden sowohl bei kleinen als auch bei größeren Strukturen (LLMOD) verwendet werden. Im Gegensatz zur MCMM-Methode wird hier bei jeder Iteration das Molekülsystem im Niedrigfrequenzbereich durch Dehnung gestört und anschließend die neu erzeugte Konformation energieminimiert. LMOD kann auch bei Konformationssuchen angewendet werden, wenn keine oder nur wenige Kenntnisse über das zu untersuchende System vorliegen. Die LLMOD-Methode funktioniert ähnlich wie LMOD, sie wird jedoch vor allem bei größeren Biomolekülen verwendet. Ein Anwendungsgebiet kann zum Beispiel die restraint-freie Suche nach Proteinstrukturen sein.

Die Mixed-Mode-Methoden sind Kombinationen zwischen MCMM und LMOD bzw. LLMOD. Dabei werden bei der Konformationssuche nach dem Zufallsprinzip einige Schritte nach MCMM und einige nach LMOD bzw. LLMOD durchgeführt. Die Wahrscheinlichkeiten der durchgeführten Schritte (MCMM vs LMOD bzw. LLMOD) ist frei wählbar. Dieser Algorithmus hat sich als schnelle und effiziente Methode für eine Vielzahl von verschiedenen Molekülsystemen bewährt. Bei der eigentlichen Struktursuche geht man im conformational-search-Modul folgendermaßen vor. Nach dem Einlesen der Startstruktur und der Charakterisierung des Moleküls (Stereochemie, Doppelbindungsgeometrie [E/Z], Ringsysteme, ...) werden die gewünschten Parameter wie Suchmethode, Kraftfeld, Lösungsmittel, Minimierungsmethode, Konvergenzkriterien und Ausgabedateiformat definiert und der Suchlauf gestartet. Je nach den gesetzten Konvergenzkriterien werden dann die berechneten Strukturen im gewünschten Ausgabedateiformat in ein zuvor definiertes Verzeichnis geschrieben.

Die hier angeführten Informationen des conformational-search-Moduls der Maestro-Schrödinger-Suite sind aus dem Benutzerhandbuch⁹⁰ bzw. aus den Seminarunterlagen⁹¹ entnommen. Eine schöne Übersicht über den Vergleich von LMOD- mit MCMM-Methoden (und deren Kombination) anhand von drei unterschiedlichen Molekülen bietet außerdem der Artikel von PARISH.⁹²

Im dritten Projekt Methylgriselimycin konnten mit den zuvor beschriebenen restraint-freien Methoden (Maestro-Schrödinger-Suite 2012⁸⁷) keine Konformere gefunden werden, welche mit den experimentellen RDCs im Einklang sind. Daher wurde eine Software gesucht, welche es erlaubt, die experimentell ermittelten restraints bereits bei der Strukturgenerierung zu berücksichtigen. SYBYL⁸⁵ gestattet zwar die Verwendung von NOE-, unterstützt aber nicht die Verwendung von RDC-restraints.

Das Softwarepaket XPLOR-NIH^{93,94} bietet die Möglichkeit, eine Vielzahl experimentell ermittelter restraints als Potentialterme während der Strukturberechnung zu verwenden. Die Zielstrukturen werden auch hier dadurch generiert, dass ein Minimum einer Zielfunktion, die aus den verschiedenen energetischen Termen zusammengesetzt ist, gesucht wird. Die einzelnen Terme bestehen aus den einzelnen NMR-Beschränkungen (restraints), den kovalenten Geometrien und den nichtbindenden Kontakten. Die Terme sind in Formel 26 beschrieben.

$$E_{pot} = E_{bonds} + E_{angle} + E_{dih} + E_{impr} + E_{vdw} + E_{exp} \quad \text{Formel 26}$$

Dabei ist E_{pot} die potentielle Gesamtenergie der Zielfunktion, E_{bonds} das Bindungspotential, E_{angle} das Winkelpotential, E_{dih} das Diederwinkelpotential, E_{impr} das Improperwinkelpotential, E_{vdw} das Van der Waals-Potential und E_{exp} das Potential der experimentellen restraints. Als Suchmethode kann in XPLOR-NIH das *Simulated-Annealing*-Protokoll (SA) verwendet werden.⁸⁴ Generell bietet dieses

Protokoll den Vorteil, dass durch das Prinzip Aufheizen und simulierte Abkühlung ein lokales Minimum auf der Potentialhyperfläche wieder verlassen werden kann um eventuell ein besseres Minimum zu finden. Für die explizite Nutzung von RDCs als Potentialfunktion gibt es verschiedene Implementierungen in XPLOR-NIH. Hier in dieser Arbeit wurde standardmäßig die *tenso*⁹⁵-Implementierung verwendet, da dieses Modul die Berechnung der axialen und rhombischen Komponente des Alignment-Tensors direkt aus der Struktur ermöglicht.

Mit den hier beschriebenen *in silico*-Methoden und Softwarepaketen wurden alle Strukturen und Ensembles in den drei Molekülprojekten in dieser Arbeit generiert bzw. verfeinert. Diese Molekülgeometrien dienten dann als Strukturvorschläge für die RDC-Analyse mit der Software *RDC@hotFCHT*.^{78,79}

3.2.3. Alignment Medien

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt, muss der zu untersuchende Analyt eine schwache Vorzugsrichtung zum externen Magnetfeld einnehmen, damit die RDCs als zusätzlicher Beitrag zur skalaren Kopplung aus den Spektren entnommen werden können. Hierzu stehen eine Vielzahl an Medien zur Verfügung, wobei die flüssigkristallinen Phasen, die Polymergele, die Bicellen⁹⁶ und die paramagnetische Tags²⁰ eine exponierte Stellung einnehmen. Da Bicellen und paramagnetischen Tags bis auf wenige Ausnahmen⁹⁷ fast ausschließlich für Biomoleküle Verwendung finden, stehen sie in dieser Arbeit nicht im Fokus. Für die Untersuchung von kleinen Molekülen und Peptiden in organischen Lösungsmitteln werden überwiegend die beiden anderen Klassen an Orientierungsmedien verwendet, zum einen *lyotrop* flüssigkristalline Phasen und zum anderen gestreckte oder gestauchte Polymergele⁹⁸ (*Strain induced Alignment in a Gel*, SAG).

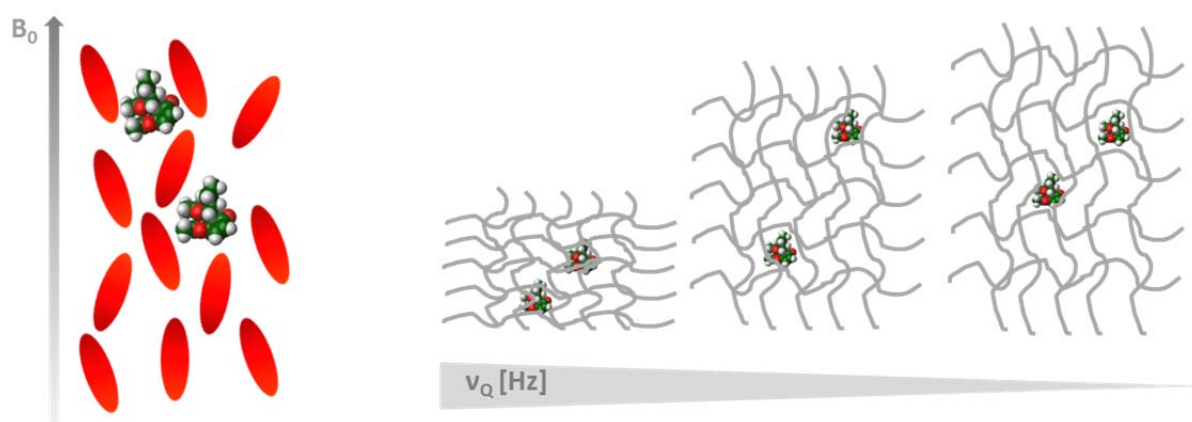


Abbildung 15: Gegenüberstellung einer flüssigkristallinen Phase und eines quervernetztem Polymergel mit Analyt. Links: Die flüssigkristalline Phase überträgt ihre Ordnung auf den Analyten, sodass er eine Vorzugsausrichtung zum Magnetfeld B_0 einnimmt. Rechts: Lässt man das Polymergel in einem NMR-Röhrchen quellen so bildet sich eine anisotrope Umgebung aus, sobald der Geldurchmesser größer als der NMR-Röhrchen-Durchmesser ist. Die Anisotropie lässt sich verstärken, wenn das Polymergel zusätzlich gestaucht wird und sich dadurch die Hohlräume, in die die Analyten eindiffundieren, verkleinern.^{113,114,115} Die somit größere Anisotropie lässt sich qualitativ an einer größeren Quadrupolaufspaltung ν_Q ablesen, siehe auch im weiterführenden Text.

Die flüssigkristallinen Phasen können in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen die *thermotropen* flüssigkristallinen Phasen (*Thermotropic Liquid Crystalline*, TLC), zum anderen die bereits erwähnten *lyotrop* flüssigkristalline Phasen (*Lyotropic Liquid Crystalline*, LLC). Die TLC-Phasen sind reine oder auch Mischungen von mesogenen Molekülen, deren Mesophasenverhalten von der Temperatur abhängig ist. Die LLC-Phasen werden von Lösungen mesogener Moleküle oder Aggregaten mesogener Moleküle in einem Lösungsmittel gebildet. Neben der Temperatur ist hier der flüssigkristalline Zustand auch noch von der Konzentration der Lösung abhängig. Die Konzentration, bei denen der Flüssigkristall seine anisotropen Eigenschaften verliert wird als kritische Konzentration bezeichnet. Eine beliebige Skalierung des Alignments ist also in den LLC-Phasen nicht möglich. Ein weiteres Klassifizierungsmerkmal von flüssigkristallinen Phasen ist der Grad der Positionsfernordnung der entsprechenden Mesogenmoleküle. Die nematisch (altgriechisch „Faden“) flüssigkristalline Phase weist die größte Ähnlichkeit mit einer gewöhnlichen Flüssigkeit auf, da sie niedrig viskos, sehr gut fließend und keine Positionsfernordnung der (meist stabförmigen) Moleküle aufweist. Die Moleküle in der Phase zeigen lediglich eine Orientierungsordnung bezüglich eines Direktors auf. Die smektischen Phasen weisen eine höhere Positionsfernordnung auf, da sie in Schichten angeordnet sind. Es gibt eine große Vielzahl von smektischen Phasen (Sm), die in der

Reihenfolge ihrer Entdeckung mit SmA, SmB, SmC, etc. bezeichnet werden. Die cholesterische Phase^{99,100} weist eine nematische Ordnung mit sich kontinuierlich drehender Vorzugsorientierung aus. Der Direktor ändert sich stetig zwischen den verdrehten Schichten (angedeutet im unteren Schema durch die grauen Pfeile). Durch diese Eigenschaft bilden cholesterische Phasen eine übergeordnete Helixstruktur aus. Mit dem optischen Polarisationsmikroskop kann die helixförmige Verdrehung des Direktorfeldes als sich wiederholendes Streifenmuster sichtbar gemacht werden, wenn die Achse senkrecht zum Lichtstrahl ausgerichtet ist. Die gestreiften Muster sind Erkennungsmerkmal der jeweiligen cholesterischen Phase und können daher als fingerprint verwendet werden. Wichtige Kenngrößen der Helix sind deren Ganghöhe und Händigkeit. Da Helices sowohl als rechts- als auch linksgängige Schrauben existieren können, sind sie chirale Objekte, die enantiomorphe Eigenschaften besitzen.

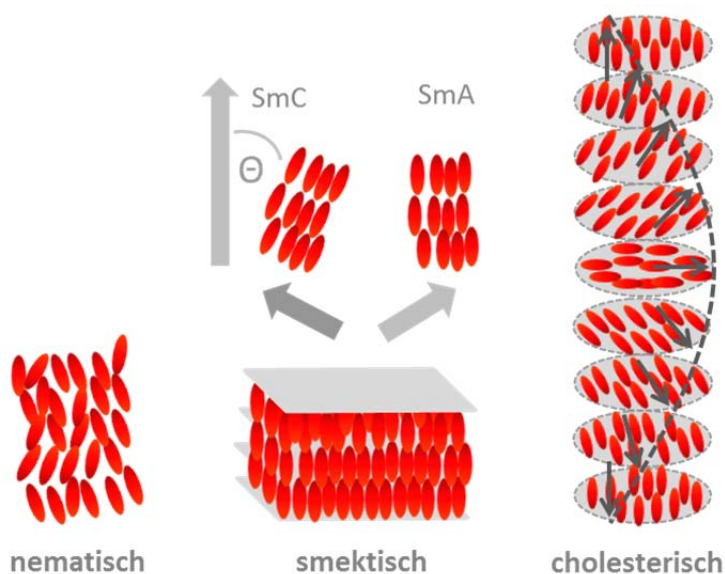


Abbildung 16: Positionenfernordnungen von flüssigkristallinen Phasen. Die smektische Phase A (SmA) hat im Vergleich zu B (SmC) keinen Winkel Θ zwischen dem Direktor und der Schichtnormalen. Die cholesterische Phase weist eine nematische Ordnung mit sich kontinuierlich drehender Vorzugsorientierung auf.

Die flüssigkristallinen Phasen können ihre inherente Anisotropie auf einen Analyten übertragen. Dazu wird das Mesogen zusammen mit dem Lösungsmittel und dem Analyten in ein NMR-Röhrchen gegeben, welches so lange auf und ab zentrifugiert wird, bis eine homogene Phase entstanden ist. Die thermotrop nematischen Medien, welche noch von Saupe^{17,18} für seine ersten Studien verwendet wurden, werden in den heutigen RDC-Analysen von kleinen Molekülen kaum verwendet, da das induzierte Alignment auf das Molekül zu stark ist. Die Verwendung von LLC-Phasen ermöglicht jedoch ein entsprechend schwaches Alignment auf den Analyten, somit können die RDCs recht einfach als zusätzlicher Beitrag zur skalaren Kopplung aus den Spektren bestimmt werden (siehe dazu auch Kapitel 3.2.4).

Die klassischen und bis dato auch am besten untersuchten LLC-Phasen für die RDC-Strukturaufklärung von kleinen Molekülen sind die Homopolypeptide Poly- γ -benzyl-L-glutamat (PBLG)^{22,101,102,103} bzw. Poly- γ -benzyl-D-glutamat (PBDG), Poly- γ -ethyl-L-glutamat (PELG)¹⁷⁸ und eher selten angewendet das Poly- ϵ -carbobenzyloxy-L-Lysin (PZLL).¹⁰⁴ Die neuen Entwicklungen im Bereich der LLC-Phasen mit chiralen organischen Polymeren, wie Polyisocyanide (PIC)¹⁰⁵, Polyguanidine (PG)¹⁰⁶ und Polyacetylene (PA)¹⁰⁷ als Alignmentmedium erweitern, u.a. aufgrund der

unterschiedlichen Lösungsmittelkompatibilitäten der Mesogene, das Spektrum der RDC-Analyse erheblich. Eine übersichtliche Zusammenstellung der Verträglichkeit der einzelnen LLC-Phasen mit verschiedenen Lösungsmittel und Additive findet man in der Dissertation von MONTAG.¹⁰⁸

Die Homopolypeptide sowie die neueren nicht-biologischen Alignment-Medien bilden zusätzlich helikale Überstrukturen¹⁰⁹ aus, die vor allem für die relative Konfigurationsaufklärung von kleinen Molekülen aber auch für die Enantiodifferenzierung eine wichtige Rolle spielen. Der Nachweis über RDCs konnte von MARX ET. AL.¹¹⁰ am Beispiel von zwei Enantiomeren ((+) bzw. (-)-Isopinocampheol) in PBLG (P-Helix) und PBDG (M-Helix) gezeigt werden. Bei diastereomorphen Wechselwirkungen des Analyten mit der LLC-Phase sind also verschiedene Orientierungen des Alignment-Tensors (siehe auch Kapitel 3.2.1) der Enantiomere beobachtbar, während enantiomorphe Wechselwirkungen zu einer identischen Orientierung führen. Bis dato ist aber noch keine Zuordnung der entsprechenden Tensor-Orientierung zum passenden Enantiomer möglich.¹¹¹ Die Bestimmung der Absolutkonfiguration mit LLC-Phasen in Kombination mit den RDCs ist daher momentan noch Gegenstand aktueller Forschung.

Eine weitere wichtige Klasse an Orientierungsmedien ist wie am Anfang des Kapitels schon kurz erwähnt, die der gestreckten oder gestauchten Polymergele.¹¹² Hier wird die Anisotropie auf den Analyten durch Stauchung oder Streckung des entsprechenden Polymergels übertragen. Praktischerweise wird das Polymerstäbchen zusammen mit dem Lösungsmittel in ein NMR-Röhrchen gegeben und so lange quellen lassen, bis eine stabile anisotrope Umgebung geschaffen wurde. Danach wird der Analyt in das Medium eindiffundieren gelassen. Die Stärke des Alignments kann sowohl über den Polymerstäbchendurchmesser, den Durchmesser des NMR-Röhrchens, als auch durch einen sogenannten *Stretching-Apparat*^{113,114,115} nahezu lückenlos den notwendigen Alignment-Bedingungen angepasst werden. Erstmals konnte 2004 eine Messung zur Bestimmung der RDCs in einem quervernetztem Polystyrol-Gel (PS) durchgeführt werden.⁹⁸ Seitdem konnte eine große Anzahl unterschiedlich vernetzter Polymergele entwickelt werden wie zum Beispiel Polydimethylsiloxan (PDMS)¹¹⁶, Polyvinylacetat (PVAc)¹¹⁷, Polyacrylamid (PAA)¹¹⁸, Polyacrylnitril (PAN)¹¹⁹, Polymethylmethacrylat (PMMA)¹²⁰, Polyurethan (PU)¹²¹, Polyethylenoxid (PEO)¹²², Poly- γ -benzyl-L-glutamat (PBLG)¹²³ und Gelatine¹²⁴, die nahezu die gesamte Bandbreite an organischen Lösungsmitteln abdecken.¹⁰⁸ Nachteilig ist jedoch, dass die Äquilibrierungszeit, d.h. die Zeit bis stabile anisotrope Verhältnisse zwischen Gel-Lösungsmittel und Analyt vorliegen, viele Tage und manchmal auch Wochen in Anspruch nehmen.

Durch Stauchung und Streckung der Polymergele bzw. durch Zugabe (bis maximal die kritische Konzentration erreicht ist) oder Abdampfen des Lösungsmittels bei den LLC-Phasen kann die Stärke des Alignments variiert werden. Die Stärke der Quadrupolaufspaltung ($\Delta\nu_Q$) des deuterierten Lösungsmittelsignals kann als Maß für den Grad der Anisotropie des Alignmentmediums verwendet werden, siehe auch Abbildung 15.¹²⁵ Je höher das Alignment, desto höher ist der Ordnungsgrad, desto größer ist die Quadrupolaufspaltung. Innerhalb verschiedener anisotroper Systeme sind die Quadrupolaufspaltungen nicht vergleichbar, da sie sowohl vom verwendeten deuterierten Lösungsmittel als auch vom Medium selbst abhängen. Um bei der späteren Messung möglichst genaue RDCs bestimmen zu können, sollte neben der Größenordnung der Quadrupolaufspaltung selbst auch auf die Peakform der beiden $\Delta\nu_Q$ -Signaläste geachtet werden. Sie sollten eine möglichst geringe Peakhalbwertsbreite (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) und eine symmetrische Peakform aufzeigen.

Eine weitere und präzisere Möglichkeit, um die Homogenität und die Stabilität zu überprüfen, ist das kürzlich entwickelte zweidimensionale Deuterium-Imaging-Experiment.¹²⁶ Die LLC-Phase oder das Gel werden hierbei durch Anwendung von z-Gradienten in Volumenschnitte aufgeteilt und somit räumlich aufgelöst gemessen. So ist es entlang der z-Richtung möglich, orts aufgelöst die

entsprechenden $\Delta\nu_Q$ zu messen. Im Idealfall sind alle $\Delta\nu_Q$ gleich groß, sodass der gelöste Analyt in jedem Volumenbereich die gleiche Anisotropie erfährt. Zusätzlich kann das Alignment entlang der z-Achse visualisiert werden.

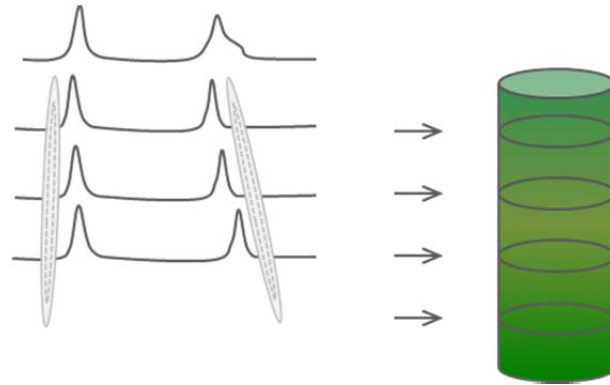


Abbildung 17: 2D-Imaging-Abbildung Polymerstick. Deutlich ist die unerwünschte Änderung der Quadrupolaufspaltung über die z-Achse des aktiven Volumens zu erkennen.

3.2.4. NMR-Experimente und Methoden zur Ermittlung der RDCs

Bei schwachem Alignment machen sich die RDCs durch einen zusätzlichen Beitrag zur Linienaufspaltung im NMR-Spektrum bemerkbar. Um daher die RDCs experimentell bestimmen zu können, ist eine Messung im isotropen (Analyt + Lösungsmittel) und eine weitere im anisotropen Medium (Analyt + Lösungsmittel + Alignmentmedium) notwendig. Die im anisotropen Medium bestimmte Kopplung wird als totale Kopplung T bezeichnet, J ist die skalare Kopplungskonstante aus dem isotropen Spektrum. Die RDCs zwischen den Kernspins können entsprechend folgender Gleichung bestimmt werden.

$$RDC_{I,S} = \frac{T_{IS} - J_{IS}}{2} \quad \text{Formel 27}$$

Bei kleinen Molekülen und Peptiden werden die RDCs meist zwischen dem Kohlenstoff bzw. Stickstoff und dem direkt gebundenen Proton gemessen. Für deren Bestimmung ($^1J_{C-H}$ bzw. $^1J_{N-H}$ und $^1T_{C-H}$ bzw. $^1T_{N-H}$) werden meist verschiedene Varianten der F2-gekoppelten HSQC-Experimente verwendet. Prominente Vertreter hierbei sind das CLIP-HSQC-Experiment (**C**Lean **I**n**P**hase) mit reinen Absorptionssignalen und das CLAP-HSQC-Experiment (**C**Lean **A**nti**P**hase) mit Absorptions- und Antiphasensignalanteil.¹²⁷ Letzteres hilft vor allem auch bei der Unterscheidung und Messung der Kopplung von diastereotopen Protonen in den Spektren. Bei stark überlappenden Signalen in der direkten F2-Dimension, wie dies zum Beispiel in Spektren von biologischen Molekülen oder auch Oligosacchariden zu erwarten ist, können auch F1-gekoppelte HSQC-Experimente mit BIRD-Filter und entsprechend angepassten Skalierungsfaktoren verwendet werden.^{128,129} Um eine gute Auflösung und damit präzise RDCs zu bestimmen müssen jedoch eine Vielzahl von F1-Inkrementen aufgenommen werden, was zu längeren Messzeiten führt. Da die $^1J_{C-H}$ Kopplung immer positiv (Größenordnung ^{13}C - 1H etwa 145 Hz) bzw. die $^1J_{N-H}$ immer negativ (^{15}N - 1H etwa -75 Hz) ist, brauchen die Vorzeichen von T nicht bestimmt zu werden (unter der Einschränkung dass $D \ll J$).

Nebenbei sei hier noch erwähnt, dass auch die RDCs von Methylgruppen¹³⁰ oder aromatischen Ringen¹³¹ bei der Analyse verwendet werden können. Aufgrund deren schneller Rotationen um die C-CH₃ bzw. N-CH₃ Achsen hängt die $^1D_{CH_3}$ Kopplung nur von dem Orientierungsvektor zwischen dem Methyl-Kohlenstoff und dem direkt gebundenem Schweratom (zum Beispiel Kohlenstoff oder Stickstoff) ab. Daher können die so gemittelten $^1D_{CH}$ -Kopplungen in die orientierungsabhängigen $^1D_{CC}$ / $^1D_{NC}$ umgerechnet werden.

$$1D_{CC} = 1D_{CH_3} \left(\frac{-3\gamma_C}{\gamma_H} \right) \left(\frac{r_{CH}^3}{r_{CC}^3} \right) \quad \text{Formel 28}$$

Bzw. analog dazu die Umrechnung einer Methylgruppe $^1D_{CH_3}$ -Kopplung in eine $^1D_{NC}$ -Kopplung

$$1D_{NC} = 1D_{CH_3} \left(\frac{-3\gamma_N}{\gamma_H} \right) \left(\frac{r_{CH}^3}{r_{NC}^3} \right) \quad \text{Formel 29}$$

Dabei entsprechen $\gamma_{C, H, N}$ den gyromagnetischen Verhältnisse der entsprechenden Kerne und r_{CH}^3 , r_{CC}^3 und r_{NC}^3 entsprechen den C-H, C-C bzw. N-C Distanzen.

Die Messung von RDCs ist aber nicht nur auf die direkt gebundenen Kerne beschränkt, sondern es können auch weitreichende nJ - bzw. nT -Kopplungen inklusive deren Vorzeichen bestimmt werden. Die Vorzeichen sind hier, im Gegensatz zu den 1J - bzw. 1T -Kopplungen, *a priori* nicht bekannt. Die Experimente zur Ermittlung weitreichender Kopplungen sind vor allem bei Verbindungen mit wenigen Protonen wichtig, damit eine ausreichende Anzahl an experimentellen RDCs für die Alignment-Tensor Berechnung ermittelt werden können. Die weitreichenden nJ -Kopplungen sind im Vergleich zu den 1J -Kopplungen sehr viel kleiner, häufig nur wenige Hz, und daher auch schwerer zu bestimmen, vor allem wenn die Linienbreite bzw. Peakintensität in der Größenordnung der Kopplung liegt. Daher können bereits kleine Fehler einen großen Einfluss auf die Dateninterpretation haben. Zusätzlich können sie ein positives oder negatives Vorzeichen haben, was eventuell eine Permutation der Vorzeichen bei der späteren Analyse nach sich ziehen kann, falls diese nicht eindeutig bestimmbar sind. Im Folgenden werden die wichtigsten Experimente anhand von Beispielen kurz vorgestellt.

Zur Bestimmung der heteronuklearen Weitbereichskopplungen ($^nJ_{C-H}$) bietet sich das HETLOC-Experiment (**HET**eronuclear **LONG** Range Coupling)^{132,133} für protonierte Kohlenstoffe oder auch alternativ die Breitband J-HMBCs¹³⁴ an. Der Vorteil des HETLOCs gegenüber den HMBCs ist vor allem, dass auch das Vorzeichen der Kopplungskonstante eindeutig aus den Spektren bestimmt werden kann. Die Kreuzsignale zeigen beim HETLOC in der inkrementierten F1-Dimension die direkte große Kopplung zum Heterokern und in der detektierten F2-Dimension die gewünschte heteronukleare Weitbereichskopplung zum gleichen Heterokern. Damit lassen sich Kopplungskonstanten bestimmen, die kleiner als die Linienbreite sind. Nachteilig ist jedoch, dass durch den TOCSY-Kohärenztransfer keine Korrelationen zu oder über quarternäre Kohlenstoffatome oder Heteroatome beobachtet werden können. Eine modifizierte Version des HETLOCs ist das HECAD-Experiment (**HET**eronuclear Couplings from **ASSCI**-Domain Experiments with *e*.COSY-type cross peaks)^{135,136} welches Signalüberlappung in der F1-Dimension reduziert, jedoch auch aufgrund der längeren Pulssequenz auch etwas unempfindlicher ist.¹³⁷

Homonukleare Weitbereichskopplungen sowie deren Vorzeichen ($^nJ_{H-H}$) können mit dem XLOC-Experiment (**X**nucleus for **LONG** range Couplings)^{138,139} oder auch mit dem E.COSY-Experiment (**E**xclusive **COR**relation Spectroscopy)¹⁴⁰ bestimmt werden. Beide Experimente weisen ein ähnliches Kopplungsmuster auf, das sogenannte E.COSY Pattern. Die beiden Experimente bieten den Vorteil, dass durch die Vereinfachung der Kreuzsignalmuster auch Kopplungskonstanten von komplizierten Spin-Systemen entnommen werden können. Dies ist bei den Doppel-Quanten-gefilterten und phasensensitiven COSY-Spektren nicht immer möglich, da es hier teilweise zur Auslöschung von nebeneinander liegenden positiven und negativen Signalen kommen kann. Dies erschwert oder verhindert die exakte Entnahme einer Kopplungskonstante.

Für die Messung von homonuklearen $^1J_{C-C}$ -Kopplungskonstanten kann das protonendetektierte 1.1-ADEQUATE-Experiment (Adequate sensitivity **DOUBLE-QUAnTum** spEctroscopy) verwendet werden.^{141,142} Aufgrund seiner Unempfindlichkeit wird dieses Experiment nur in Ausnahmefällen, z. B. wenn molekülbedingt nicht genügend andere RDCs bestimmt werden konnten, verwendet. Erschwerend kommt hinzu, dass die Kopplungen in der skalierten F1-Dimension abgelesen werden. Dadurch ist eine hohe Anzahl an Inkrementen notwendig, um eine hinreichende Genauigkeit der Kopplungskonstanten zu erhalten, was vor allem bei den anisotropen Messungen zu langen Messzeiten führt. Manchmal ist dieses Experiment aber der letzte Ausweg bei der Analyse von kleinen Molekülen um eine ausreichend große Anzahl an RDCs für eine genaue Datenanalyse zu erhalten. Die $^1J_{C-C}$ -Kopplungen sind immer positiv. Somit ergeben sich im Fall schwacher Orientierung der Betrag und das Vorzeichen von $^1D_{C-C}$, analog zum CLIP/ CLAP-HSQC, direkt aus der Änderung der

Linienaufspaltung. In der folgenden Tabelle ist eine grobe Gesamtübersicht über einige der vielen 2D-NMR-Experimente für die Bestimmung von Kopplungskonstanten wiedergegeben. Sie hat keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Die Kopplungsbestimmungen bei Experimenten mit langen Pulssequenzen sind in anisotropen Medien aufgrund der Linienverbreiterungen häufig schwierig und führen daher nicht immer zum Erfolg.

Tabelle 2: Auswahl an zweidimensionalen NMR-Experimenten zur Bestimmung von Kopplungskonstanten für die RDC-Analyse. Eine gesamtethliche Übersicht über die weitreichenden Protonen-Kohlenstoffkopplungen mit entsprechenden Anwendungen bietet auch der Artikel von PARELLA und ESPINOSA in der Zeitschrift „Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy“.¹⁴³

(RDC)-Kopplung	Experiment	Bemerkungen	Referenz
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^1\text{D}_{\text{NH}}$	CLIP/ CLAP- HSQC	Phasensensitiv, die Vorzeichen sind bekannt	127
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^1\text{D}_{\text{NH}}$	HSQC- IPAP		144
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^1\text{D}_{\text{NH}}$	J-X-Bird ^{d,x} - HSQC	Phasensensitiv, die Vorzeichen sind bekannt	124, 145
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^1\text{D}_{\text{NH}}$	F1-gekoppeltes HSQC	Phasensensitiv, die Vorzeichen sind bekannt	128,129
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^1\text{D}_{\text{NH}}$	F1-gekoppeltes HSQC	Phasensensitiv, die Vorzeichen sind bekannt, nur diastereotope Protonen	146,129
$^n\text{D}_{\text{HH}}$	E. COSY	Phasensensitiv und relatives Vorzeichen bekannt	140
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^n\text{D}_{\text{HH}}$	XLOC	Nicht phasensensitiv, Vorzeichen bestimmbar	138, 139, 147
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^n\text{D}_{\text{HH}}$	HETLOC	Phasensensitiv, Vorzeichen bestimmbar	132, 133
$^n\text{D}_{\text{CH}}, ^n\text{D}_{\text{HH}}$	HECADE	Phasensensitiv, Vorzeichen bestimmbar, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ zum quarternären Kohlenstoff möglich	135, 136
$^n\text{D}_{\text{CH}}$	J-HMBC	Nicht phasensensitiv, Vorzeichen nicht bekannt	138, 148
$^n\text{D}_{\text{CH}}$	J-HMBC (antiphase)	Phasensensitives HMBC, Vorzeichen nicht bekannt	149, 150,151,152
$^n\text{D}_{\text{CH}}$	HSQMBC	IPAP, J-aufgelöst oder E. COSY	153, 154, 155, 156, 157
$^1\text{D}_{\text{CH}}, ^n\text{D}_{\text{CH}}, ^{n+1}\text{D}_{\text{HH}}$	P.E.HSQMBC		153
$^n\text{D}_{\text{CH}}$	HSQMBC-COSY-TOCSY	IPAP, Vorzeichensensitiv, $^n\text{J}_{\text{CH}}$ zum quarternären Kohlenstoff möglich	158, 159
$^1\text{D}_{\text{CC}}, ^n\text{D}_{\text{CC}}$	ADEQUATE	IP, Kopplung in F1	141, 142, 160
$^1\text{D}_{\text{CC}}, ^n\text{D}_{\text{CC}}$	INADEQUATE	IPAP, nur bei hohen Konzentrationen anwendbar	161
$^2\text{D}_{\text{HF}}, ^2\text{D}_{\text{HH}}$	$^1\text{H}, ^{19}\text{F}$ -S ³ E-E. COSY		162

3.3. Praktische Aspekte der RDC- und NOE/ ROE-Analyse in der Strukturanalytik von kleinen Molekülen und Peptiden

Am Ende dieses Kapitels ist eine umfangreiche Tabelle angeführt, die eine Übersicht über kleine und mittelgroße Moleküle zeigt, welche in der jüngeren Vergangenheit hauptsächlich mit RDC-Methoden untersucht wurden. Da in der Dissertation von BÖTTCHER¹⁶³ bereits einige der in der Tabelle angeführten Moleküle erörtert wurden, wird an dieser Stelle der Fokus speziell auf die zyklischen Peptide und auf die Problematik der RDC-Analyse mit Mindermengen, wie zum Beispiel häufig bei Naturstoffen der Fall, gelegt. Diese Aspekte spielen auch im kumulativen Teil dieser Arbeit eine wesentliche Rolle. Zunächst folgt aber erst eine kurze Beschreibung der charakteristischen strukturellen Eigenschaften von Peptiden, bevor die entsprechenden Beispiele aus der Tabelle 3 genauer beschrieben werden.

3.3.1. Strukturanalysen von Peptiden mit Torsionswinkel-, NOE- und RDC-Daten

Peptide bestehen wie Proteine aus Aminosäuren, die über eine Peptidbindung miteinander verknüpft sind. Allgemein spricht man von einem Peptid, wenn die Kettenlänge aus maximal 100 Aminosäuren besteht.¹⁶⁴ Aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters ist die Peptidbindung eher starr und planar, eine freie Rotation um die Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoff und dem Stickstoff ist also nur eingeschränkt möglich, siehe Abbildung 19. Der Torsionswinkel phi (φ) beschreibt bei Peptiden den Winkel um die C α -N-Bindung, der Winkel psi (ψ) um die C α -C-Bindung und der Winkel omega (ω) um die C-N-Bindung. Praktisch können die Torsionswinkel direkt aus den Strukturen ausgemessen werden, da die Winkel jeweils durch die vier Atome definiert werden, die sich regelmäßig durch das Peptidrückgrat ziehen. Die Indizes in Abbildung 18 bedeuten jeweils die vorangegangene Aminosäure (i-1), die betrachtete Aminosäure (i) und die folgende Aminosäure (i+1).

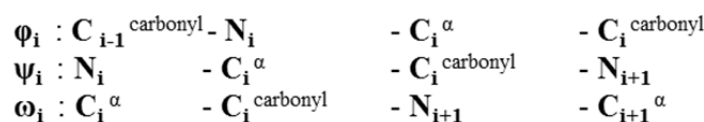


Abbildung 18: Jeweils vier Atome definieren die Torsionswinkel φ , ψ und ω . Der Index i bezeichnet die entsprechende Aminosäure, i-1 und i+1 jeweils die vorangegangene bzw. nachfolgende Aminosäure.

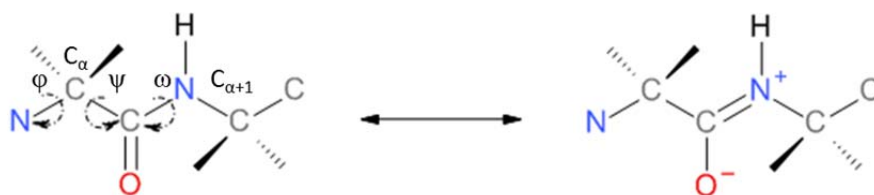


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Resonanzstruktur einer *trans*-Peptidbindung (partieller Doppelbindungscharakter) und der Torsionswinkel (Diederwinkel) φ , ψ und ω .

Der Winkel ω kann nur die Werte um 180° für die *trans*- und 0° für die *cis*-Peptidbindung annehmen mit starker Bevorzugung der *trans*-Peptidbindung. Die Winkel φ und ψ können verschiedene Werte annehmen, wodurch sich die unterschiedlichen Konformationen (Sekundärstruktur) eines linearen Peptids ergeben. Nimmt die Peptidkette eine gestreckte Konformation ein, betragen beide Winkel φ und ψ genau 180°. Die peptidischen Sekundärstrukturen wie α -Helices, β -Faltblätter oder auch

spezielle Schleifen¹⁶⁵ (*turns*), die durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden, weisen aufgrund der sterischen Hinderungen der Seitenketten charakteristische ϕ und ψ -Kombinationen auf. Welche Winkel ϕ und ψ genau für die entsprechende Sekundärstruktur möglich sind, zeigt der Ramachandran-Plot.¹⁶⁶ Der Plot stellt auf der Abszisse den Winkel ϕ von -180° bis 180° und auf der Ordinate den Winkel ψ von -180° bis 180° dar. Die NMR-Methoden zur Bestimmung der Kopplungskonstanten und deren Zusammenhang mit den Torsionswinkeln ϕ , ψ , ω sind im Kapitel 3.1 beschrieben.

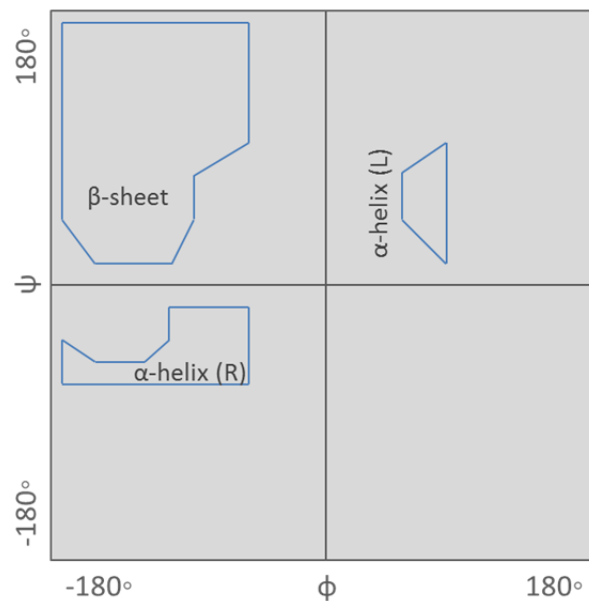


Abbildung 20: Schematische Darstellung eines Ramachandran-Plots. Aus den Schnittmengen der entsprechenden Winkelkombinationen ϕ und ψ kann die Sekundärstruktur (blaue Umrandungen) des Peptids oder auch Proteins ermittelt werden. Die in Klammern gesetzten Buchstaben (L) bzw. (R) beschreiben linksgängige (selten) und rechtsgängige Helix (häufig).

Zyklische Peptide enthalten mehrere Aminosäuren, die in sich geschlossene Ringe bilden. Sie besitzen daher keinen C-Terminus und keine N-terminale Aminosäure. Die Aminosäuren in den zyklischen Peptiden können klassisch über Amid-Bindungen verknüpft sein (homodetische Peptide) aber auch über Ester- und Disulfid-Brücken (heterodetische Peptide). Zusätzlich können in den ringförmigen Peptiden *cis*-Peptidbindungen vorliegen (vor allem bei prolinhaltigen Peptiden), während in den meisten (kettenförmigen) Proteinen die *trans*-Peptidbindungen dominieren.¹⁶⁷ Durch die Zyklisierung ist die konformationelle Vielfalt im Vergleich zu linearen Peptiden stark eingeschränkt. Aus pharmazeutischer Sicht kann diese Einschränkung von Vorteil sein, da sie zu höherer Affinität und Selektivität am Rezeptor führen kann. Durch die synthetische N-Methylierung von Peptidbindungen kann die Konformation, aber auch das *cis-trans*-Gleichgewicht von zyklischen Peptiden stark beeinflusst werden. Neben der N-methylierten Aminosäure werden auch die benachbarten Konformationen beeinflusst, was zu Veränderungen im Peptidrückgrat führen kann.¹⁶⁷

Cyclosporin A (CsA) ist der Klassiker unter den N-methylierten zyklischen Peptidwirkstoffen und wird in der Medizin u.a. als Immunsuppressivum gegen die Abstoßung von transplantierten Organen verwendet. Das eher hydrophobe Peptid ist aus elf zum Teil nicht-proteinogenen Aminosäuren zusammengesetzt (siehe Abbildung 21).

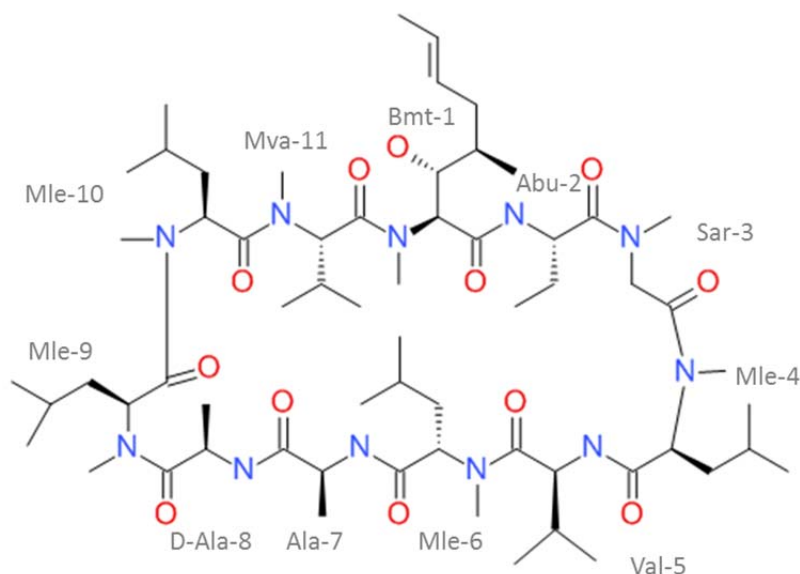


Abbildung 21: **Cyclosporin A (CsA)** ist ein zyklisches Peptid, das aus elf zum Teil modifizierten Aminosäuren besteht.

Neben der Röntgenstrukturaufklärung spielten NMR spektroskopische Untersuchungen von CsA, die vor allem in der Gruppe von KESSLER durchgeführt wurden¹⁶⁸, eine entscheidende Rolle im Hinblick auf das Verständnis und die Struktur von CsA. 2005 wurde in der Gruppe von LUY erstmals das Cyclosporin A als Testsubstanz in einem kreuzvernetzten PDMS-Gel in DMSO mit Hilfe der RDC-Methode untersucht.¹⁶⁹ Die Analytkonzentration betrug hierbei 5 mM. Insgesamt konnten so 35 RDCs zwischen -22,3 und 27.9 Hz bei einer Quadrupolaufspaltung von $\nu_Q = 40.4$ Hz bestimmt werden. Unter Verwendung der ermittelten Konformation aus der Röntgenstrukturanalyse (Korrelationsfaktor $R = 0.586$) und auch aus den NOE-Messungen (Korrelationsfaktor $R = 0.543$) konnte zunächst keine gute Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten RDCs gefunden werden. Durch einen RDC-Verfeinerungsprozess konnte die Korrelation auf $R = 0.997$ verbessert werden. Hierzu wurden zu der NOE-Startstruktur die bestimmten $^1D_{CH}$ -Kopplungen unter Verwendung sani-Implementierung¹⁷⁰ in XPLOR-NIH^{93,94} sukzessive hinzugefügt, wodurch ein Satz von Strukturen erhalten werden konnte, die lediglich einen RMSD von 0,12 Å über alle Schweratome aufwiesen. Die so ermittelte Konformation erfüllte sowohl die NOE- als auch die RDC-restraints. In der Abbildung 22 sind die strukturellen Unterschiede der am $\beta^{II'}$ -turn (Abu-2, Sar-3, MeLeu-4, Val5) überlagerten Röntgen-, der NOE- und der RDC-Struktur von CsA gezeigt. Die RDC-Struktur erfüllt sowohl die RDC- als auch die NOE-restraints.

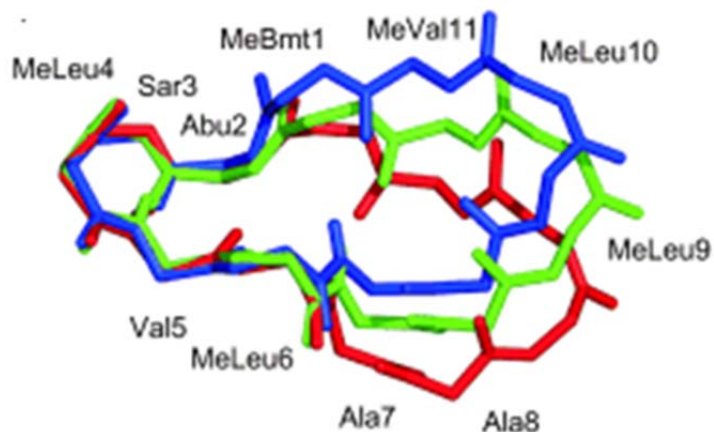


Abbildung 22: **Cyclosporin A**: Überlagerung der Röntgenstruktur (rot), NOE-Struktur (grün) und RDC-Struktur (blau) im gut definierten β -turn (Abu-2, Sar-3, MeLeu-4 und Val-5).¹⁶⁹ Die Abbildung wurde aus J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1672-1678, DOI 10.1002/cbic.200500146 entnommen. Die Abduckerlaubnis wurde erteilt.

Während die Röntgenstruktur (rot) in der Überlagerung eher abgeflacht erscheint, krümmt sich die NOE-Struktur (grün) leicht über das Peptid-Rückgrat (Backbone) während die RDC-Struktur (blau) eine deutliche Krümmung aufzeigt, was sich auch in der geringfügigen Änderung der Torsionswinkel zeigt. Hiermit konnte erstmals an einem Modellpeptid gezeigt werden, dass die eher kurzen NOE-Distanzen nur bedingt in der Lage sind, die weitreichenden räumlichen Verknüpfungen über alle Aminosäuren hinweg zu beschreiben. Daher sollte die RDC-Analyse als Komplementärmethode zur NOE- bzw. ROE-Analyse bei Peptiden angewendet werden.

Auch bei der Konformationsaufklärung von **Hormaomycin**¹⁷¹ führte die Kombination von NOE- und gleichzeitiger RDC-Analyse zu neuen Erkenntnissen. Das Depsipeptid ist eine intrazelluläre Signalsubstanz dessen einzige proteinogene Aminosäure das (S)-Isoleucin [(S)-Ile] ist. Weiterhin besteht das Depsipeptid aus zwei Einheiten von (2S, 3R)-3-methylphenylalanin [(β-Me)Phe], einer Einheit (R)-allo-Threonin [α-Thr], zwei Einheiten (1'R, 2'R)-3-(2-nitrocyclopropyl) alanin [3-Ncp)Ala] und einer Einheit (2S, 4R)-4-(Z)-propenylprolin [(4-Pe)Pro]. Das Ende der Seitenkette von Hormaomycin ist der durch eine Amidbindung gekoppelte 5-Chlor-1-hydroxypyrrol-2-carbonsäure Rest [Chpca].

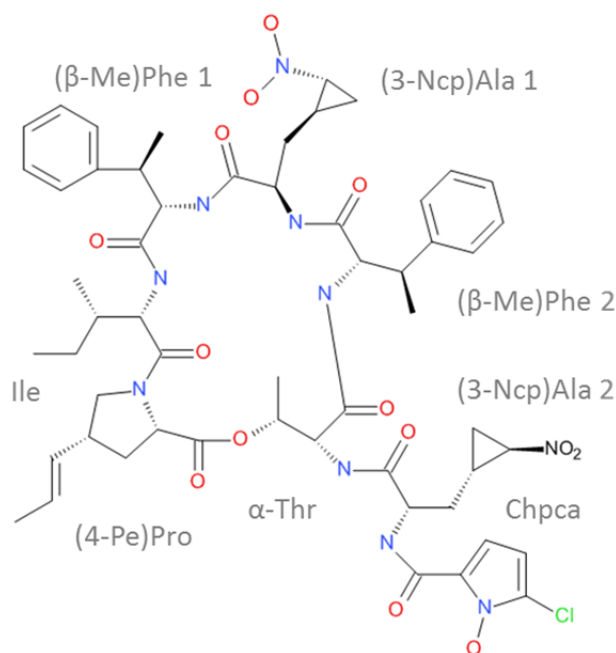


Abbildung 23: Das zyklische Depsipeptid **Hormaomycin** besteht aus sieben Aminosäuren. Bis auf die Aminosäure (S)-Isoleucin sind alle anderen nicht-proteinogen.

Bei der NMR spektroskopischen Untersuchung des Makrozyklus¹⁷² in DMSO konnten zwei Strukturbündel (NJa und NJb, aus insgesamt 900 generierten Strukturen) identifiziert werden, die sowohl im Einklang mit den NOEs- als auch den J-Kopplungen waren. Zu deren Bestimmung wurden insgesamt 85 NOE-Kontakte und acht Torsionswinkel verwendet. Die beiden Hauptkonformationen müssen aber nicht unbedingt aufgrund molekularer Flexibilität bestehen, es besteht auch durchaus die Möglichkeit, dass nicht genügend experimentelle NOE-Daten und Torsionswinkel ermittelt wurden, um eine einzelne Hauptkonformation des Makrozyklus zu ermitteln, welche alle Randbedingungen erfüllt. Um diesen Sachverhalt näher zu prüfen, wurden zusätzliche RDC-Untersuchungen in DMSO unter Verwendung eines Polyacrylamid-Gels durchgeführt. Insgesamt konnten 54 RDCs (6 x NH und 48 x CH) zwischen -21.9 und 35 Hz bei $\nu_Q = 3.5$ Hz bestimmt werden.

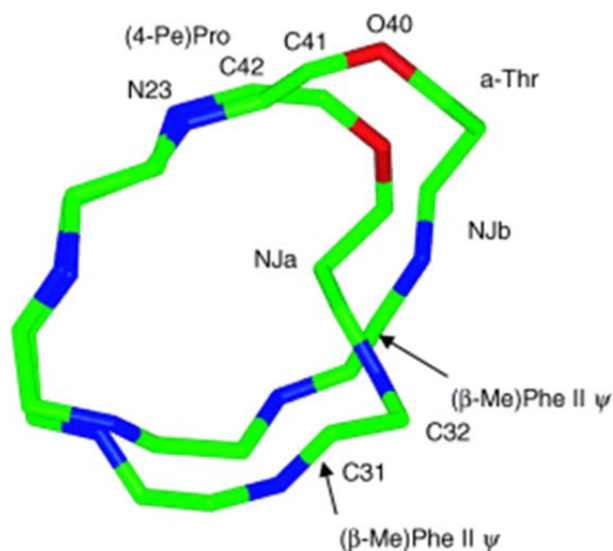


Abbildung 24: **Hormaomycin**: Darstellung der beiden Hauptkonformere (NJa und NJb) des NOE-/ J-Kopplungsensembles in DMSO. Sie zeigen vor allem größere Unterschiede im $(\beta\text{-Me})\text{Phe } 2 \psi$ Torsionswinkel.¹⁷² Die Abbildung wurde aus U. M. Reinscheid, J. Farjon, M. Radzom, P. Haberz, A. Zeeck, M. Blackledge, C. Griesinger, *ChemBioChem* **2006**, 7, 287-296, DOI 10.1002/cbic.200500277 entnommen. Die Abduckerlaubnis wurde erteilt.

Unter Verwendung von 16 Rückgrat-RDCs und Abschätzung des Alignment-Tensors konnte ein Bündel von 40 Strukturen berechnet werden, welches lediglich der Hauptkonformation NJb entspricht. Aufgrund der zusätzlichen RDC-Analyse konnte also das Hauptkonformer NJa, welches im Einklang mit den NOE-Kontakten war, erst mal ausgeschlossen werden. In einem anschließenden Verfeinerungsprozess, in dem auch die RDCs der Seitenketten verwendet wurden, konnte dieses Ergebnis bestätigt werden.

In einem dritten Beispiel wurde kürzlich der Makrozyklus **Cyclolinopeptid A** (CLA) in Chloroform mit RDCs untersucht und verfeinert.¹⁷³ CLA ist ein natürlich vorkommendes Nonapeptid dessen Konformation in Lösung erstmals im Jahre 1971 NMR spektroskopisch untersucht wurde.¹⁷⁴ Das Peptid besteht aus den Aminosäuren Phenylalanin (2x), Leucin (2x), Isoleucin (2x), Valin (1x) und Prolin (2x), welche alle *L*-konfiguriert sind.

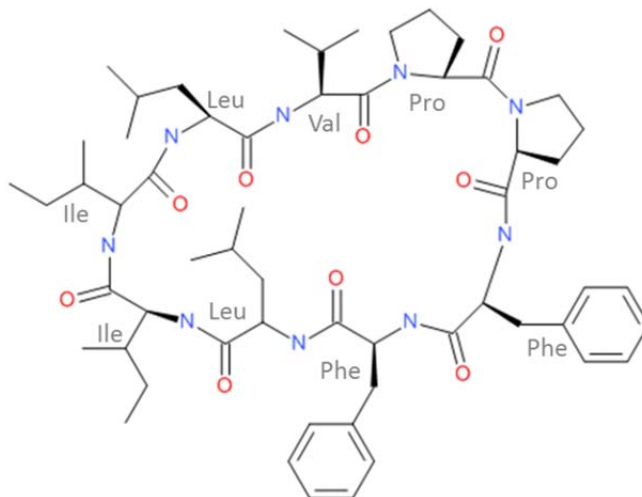


Abbildung 25: Struktur von **Cyclolinopeptid A**. Alle Aminosäuren sind *L*-konfiguriert.

In der NOE-Analyse konnten insgesamt 50 Kontakte bestimmt werden. Zusätzlich konnten fünf Torsionswinkel aus den Kopplungskonstanten berechnet werden. Für die anschließende RDC-Bestimmung wurde der Analyt in einem PDMS-Gel in CDCl_3 bei -50°C orientiert. Aus den entsprechenden Spektren konnten 48 RDCs zwischen -22.4 und $+20.1$ Hz bei $\nu_Q = 23.6$ Hz bestimmt werden, darunter auch 4 NH-Kopplungen. Auch hier erfüllten weder die Röntgen-, noch die durch die NOE-Kontakte und Torsionswinkel bestimmte Struktur die RDC Bedingungen, beide Anpassungen waren schlecht ($R = 0.284$ bei der Röntgen- und 0.315 bei der NOE-Struktur). Nach dem Clustern der RDCs in sechs Gruppen (6x $\text{C}_\alpha\text{H}_\alpha$, 9x $\text{C}_\beta\text{H}_\beta$, 13x CH-Kopplungen der Proline, 4x NH-Kopplungen, 6x $\text{C}_\gamma\text{H}_\gamma$, 5x CH-Kopplungen der Methylgruppen und sechs Kopplungen der aromatischen CHs) und sukzessiver Einbringung in die Strukturberechnung konnte ein CLA-Strukturbündel ermittelt werden, welches eine exzellente Übereinstimmung zwischen den experimentellen und den berechneten RDCs ergab ($R = 0.983$). Die Mehrheit der NOE-Kontakte ist im Einklang mit dem ermittelten Cluster, lediglich fünf sind geringfügig verletzt worden.

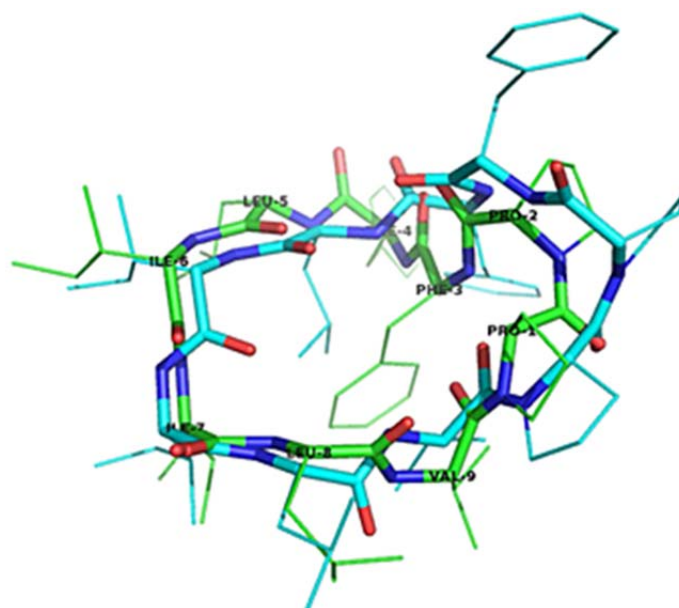


Abbildung 26: **Cyclolinopeptid A**: Überlagerung der mit RDC-Werten verfeinerten Struktur (grün) mit der NOE-abgeleiteten Struktur (blau).¹⁷³ Die Abbildung wurde aus K. Huben, M. Jewgiński, A. Pabis, P. Paluch, B. Luy, S. Jankowski, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 901-907, DOI 10.1002/psc.2683 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.

Um die Stabilität der RDC-Konformation zu überprüfen wurde eine moleküldynamische Rechnung in CDCl_3 durchgeführt. Ein RMSD-Wert von $1.23 \text{ \AA} \pm 0,10 \text{ \AA}$ bestätigte, dass während der Simulation keine signifikante Änderung der Backbone-Struktur stattfindet. Eine anschließende Clusteranalyse über alle Schweratome des Backbones zeigte, dass wirklich nur eine Hauptkonformation vorliegt. Diese ist im Gegensatz zur NOE- und Kristallstruktur im Einklang mit den experimentellen RDC-Werten.

Alle drei beschriebenen Beispiele an bereits literaturbekannten zyklischen Peptiden zeigen, dass es sich lohnt, neben den traditionellen Techniken wie Röntgen- und NOE-Strukturanalysen auch die RDCs in der Strukturbestimmung von Peptiden zu berücksichtigen. Die große Auswahl an Alignment-Medien und die Verträglichkeit mit verschiedenen Lösungsmitteln erleichtern heutzutage deren Einsatz. Daher wurde die RDC-Methode auch in dieser Arbeit an einem erst kürzlich wiederentdeckten zyklischen Depsipeptid angewendet, siehe dazu auch Kapitel 4.1.

3.3.2. Untersuchung von Naturstoffen mit RDCs und Behandlung von Mindermengen

Naturstoffe bieten eine reiche Quelle an einzigartigen Strukturen, die als Zielmoleküle in der Medizinalchemie für spätere pharmazeutische Wirkstoffe dienen können. Da aber meist nur geringe Substanzmengen isoliert werden können, ist deren NMR spektroskopische Untersuchung häufig besonders herausfordernd. Dies betrifft vor allem auch deren Untersuchung mit RDCs, da die Methode u.a. aufgrund von geringer Empfindlichkeit und häufig störendem Hintergrundsignal des Alignment Mediums bisher nur bei höheren Analytkonzentrationen eingesetzt wurde. Kürzlich konnte jedoch an dem Naturstoff Vatiparol gezeigt werden, dass es bei geeigneter Spektrometer-Hardware und spezieller Probenpräparation auch bei einer Substanzmenge von nur einem Milligramm möglich ist, die relative Konfiguration und Konformation mit Hilfe der RDCs zu bestimmen.¹⁷⁵

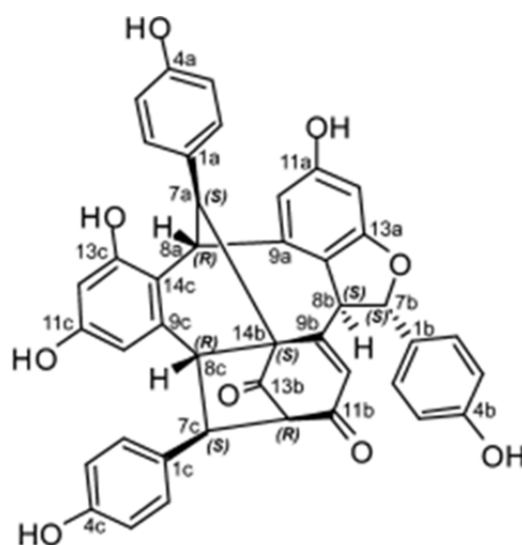


Abbildung 27: Vatiparol mit acht stereogenen Zentren, gezeigt in der Absolutkonfiguration *SRSSRSSR*. Die Konstitution des Kohlenstoffgerüsts ebenso wie dessen Konfiguration wurde hier erstmals beschrieben.¹⁷⁵ Die Abbildung wurde aus H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 5213–5221, DOI 10.1002/chem.201104078 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.

Die Konstitution von Vatiparol konnte mit massenspektrometrischen- und NMR spektroskopischen Methoden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, eindeutig geklärt werden. Die Bestimmung der relativen Konfiguration der acht stereogenen Zentren erfolgte mit RDCs, da andere analytische Methoden (Mosher-Ansatz¹⁷⁶ und Röntgenstrukturanalyse) aufgrund der Moleküleigenschaften von Vatiparol nicht angewendet werden konnten. Die anisotrope Probenpräparation erfolgte in einem 1,7 mm NMR-Röhrchen, üblicherweise werden meist 5 mm NMR-Röhrchen verwendet, um eine entsprechend hohe Analytkonzentration im Röhrchen zu erreichen. Hierzu musste eigens ein entsprechendes Gel (PH-Gel¹¹⁸) mit geeigneten Durchmesser präpariert werden, welches sicher in das dünne NMR-Röhrchen eingebracht werden kann. Die Verwendung von flüssigkristallinen Phasen scheiden bei diesen dünnwandigen 1,7 mm NMR-Röhrchen eher aus, da eine homogene Durchmischung zwischen Mesogen und Lösungsmittel nur sehr schwierig zu bewerkstelligen ist.



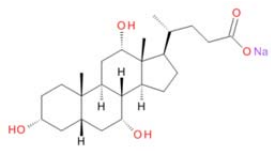
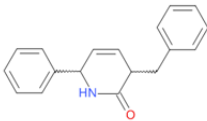
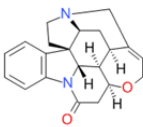
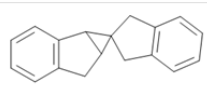
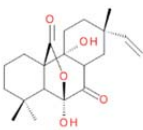
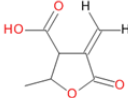
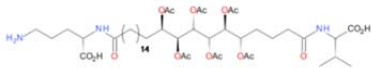
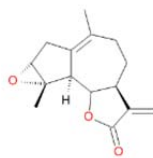
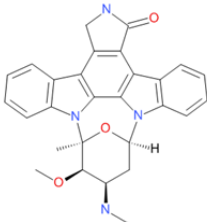
Abbildung 28: Vergleich zwischen einem 5 mm und 1.7 mm NMR- Röhrchen mit den entsprechenden Alignment Gelen.¹⁷⁵ Die Abbildung wurde aus H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 5213–5221, DOI 10.1002/chem.201104078 entnommen. Die Abdruckerlaubnis wurde erteilt.

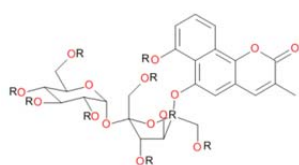
Für die Messungen der Vatiparol-Proben in den 1,7 mm Röhrchen wurde ein 1,7 mm Cryo-Mikro-Probenkopf eingesetzt, um höchste Empfindlichkeit zu erreichen. Unter diesen Messbedingungen und der so präparierten Probe, 1 mg Substanz, 50 μL Lösungsmittel (DMSO) und dem 1,7 mm PH-Gel, konnten aus den CLIP-HSQC Spektren insgesamt 16 $^1\text{D}_{\text{CH}}$ -Kopplungen zwischen -45 und 50 Hz bestimmt werden. Jedoch dauerte auch hier die Messzeit unter diesen optimalen Bedingungen an einem 700 MHz NMR-Gerät, bei 512 Inkrementen und 128 Scans pro Inkrement, 41 Stunden.

Mit den ermittelten 16 RDCs und den 56 NOE-Distanzen konnte die relative Konfiguration der acht Stereozentren und Konformation ermittelt werden (*SRSSRSSR*). Diese Konfiguration konnte auch auf der Basis einer DFT-Molekülgeometrieoptimierung unter Berücksichtigung der NOE-Kontakte bestätigt werden. Verwendet man diese Konfiguration als Strukturvorschlag bei der RDC-Analyse, so erhält man einen Qualitätsfaktor von $Q = 0.04$. Alle anderen Diastereomere von Vatiparol weisen einen deutlich größeren Q-Wert und mehrere signifikante NOE-Verletzungen auf. Durch diese präzise experimentelle Bestimmung der Relativkonfiguration und Konformation konnte anschließend die *absolute* Konfiguration mit chiroptischen Methoden (electronic circular dichroism (ECD) und optical rotatory dispersion (ORD)) eindeutig bestimmt werden.

Die beiden in diesem Kapitel beschriebenen Aspekte, die Konformationsbestimmung von zyklischen Peptiden und die Bestimmung von RDCs mit wenig Substanzmaterial bei Naturstoffen, zeigen neuere Entwicklungen und Anwendungsgebiete bei der RDC-Analyse. Diese gehen einher mit der Optimierung und Entwicklung von immer effizienteren und kompatibleren Alignment-Medien, aber auch die voranschreitende Messtechnik erlaubt es mittlerweile, dass die RDC-Analysen nicht nur wie anfänglich an Modellverbindungen, sondern auch direkt in der Analytik bei gänzlich unbekannten Molekülgeometrien eingesetzt werden können. Am Ende dieses Kapitels ist eine Tabelle angefügt, die einen Überblick über die bisher untersuchten niedermolekularen Verbindungen mit Hilfe RDC-Analyse gibt.

Tabelle 3: Prominente Beispiele von RDC-Analysen an niedermolekularen Verbindungen. In der Pharmakologie und Biochemie werden Moleküle mit einer Molmasse von weniger als 800 g/Mol als niedermolekular bezeichnet. An dieser Stelle werden zusätzlich auch kleine Peptide mitangeführt, da sie auch in organischen Lösungsmitteln (mit Alignmentmedium) gemessen wurden.

Struktur	Verbindung	Mesogen/ LM	Jahr	Referenz
<u>Konfiguration/ Chiralität</u>				
	Natrium- Cholate	Crosslinked- Polyacrylamide-gels/ DMSO	2003	177
	Dihydropyridone	PBLG/ CDCl ₃	2003	103
	Strychnine	PELG/ CDCl ₃	2004	178
	Spiroindene	PDMS/ CDCl ₃	2005	179
	Sphaeropsidin A	PVAC/ DMSO	2005	117
	α -Methylen- γ -butyrolacton	(C12E5)/ n-Hexanol/ D2O	2006	180
	Sagittamide A	PH-PDMAA, PAN/ DMSO	2007	181
	Ludartin	PMMA/ CDCl ₃	2008	120
	Staurosporine	Deuterated-PS/ CDCl ₃	2008	182

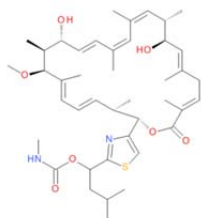


Sucro-neolambertellin

PH-PDMAA, PAN/ DMSO

2008

183

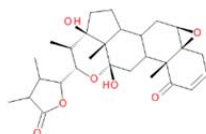


Archazolide A

PH-PDMAA/ DMSO

2008

184



Jaborosalactol 24

PMMA/ CDCl₃

2009

185

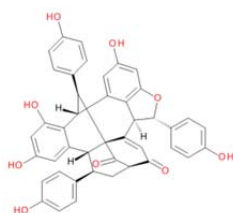


Dibromopalau'
amine

PAN-gel/ DMSO

2010

186

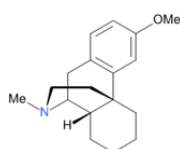


Vatiparol

PH-gel, 1,7 mm tube/
DMSO

2012

175

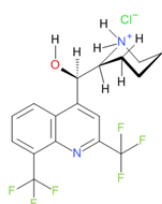


Dextro-
methorphan

PS/ CDCl₃

2010

187

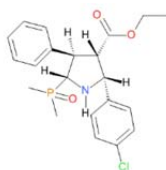


(-)-erythro-Mefloquine
HCl

APhES/DMAA-gel/ MeOD

2012

188

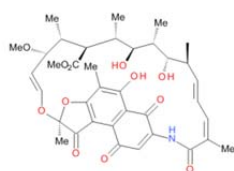


tetra- substituierte
pyrrolidine Ringe

PDMS/ CDCl₃

2012

189



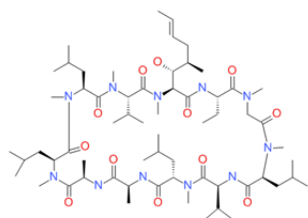
Rifamycin-S

PDMS/ CDCl₃

2013

190

Konformation/ Dynamik/ Flexibilität

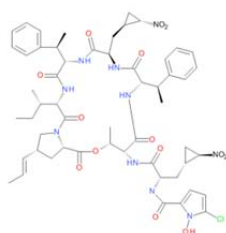


Cyclosporin A

PDMS/ CDCl₃

2005/
2013

169

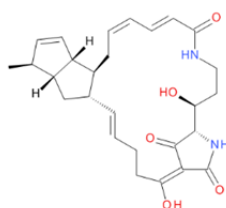


Hormamycin

PH-PDMAA/ DMSO

2006

172

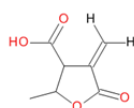


Cylindramide A

PAN/ DMSO

2008

191

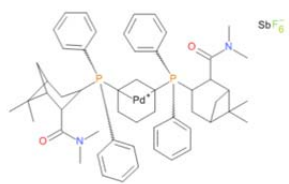


α -Methylen-
 γ -butyrolacton

(C12E5)/ n-Hexanol/ D2O

2009

192

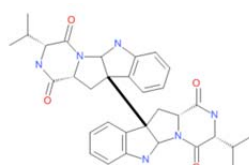


PD- Katalyse
Schlüssel-intermediat

PBLG/ CD₂Cl₂

2010

193

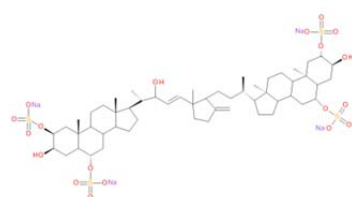


Bispyrrolidino-indoline
diketopiperazin
Alkaloide

PDMS/ CDCl₃

2011

194

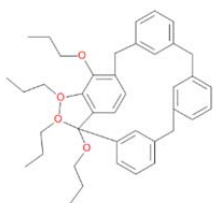


Fibrosterolsulfat A

PAN/ DMSO

2011

195

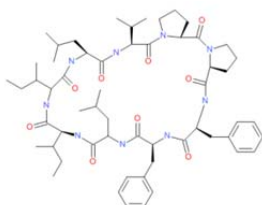


Calix[4]arenes

PBLG/ CDCl_3

2014

196



Cyclolipoptide A

PDMS/ CDCl_3

2014

173

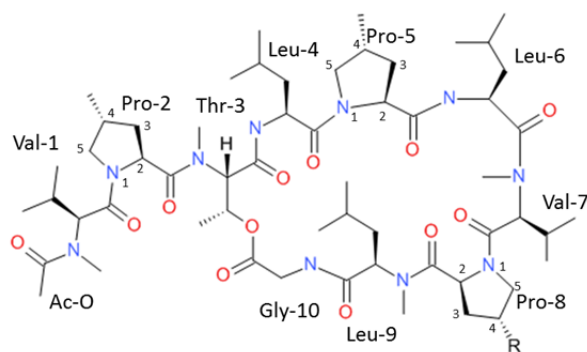
4. Ergebnisteil der Dissertation

4.1. Griselimycine

4.1.1. Herkunft, Funktion und Zielsetzungen

Die Entdeckung von Streptomycin begründete das Zeitalter der Tuberkulose-Therapie. Trotz der nachfolgenden Entwicklung einer kurativen Therapie für diese Krankheit bleibt Tuberkulose ein weltweites Problem, und die Entstehung multiresistenter *Mycobacterium tuberculosis*-Stämme hat den Bedarf für neue Medikamente priorisiert. Ein aus den Stämmen *S. griseus* und *S. coelicus* isoliertes Nebenprodukt des Griselimycins (GM), das Derivat Methylgriselimycin (MGM) sowie das totalsynthetisch hergestellte Analogon Cyclohexylgriselimycin (CGM)^{26,197,198} zeigen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hohe Aktivität gegen *M. tuberculosis* und sind somit beide vielversprechende Wirkstoffkandidaten.²⁷ Chemisch sind GM, MGM und CGM zyklische Depsipeptide¹⁹⁹, die aus zehn Aminosäuren zusammengesetzt sind, siehe auch Abbildung 29. Der strukturelle Unterschied zwischen den drei Peptid-Derivaten ist die Anwesenheit von *L*-(*R*)-4-Methylprolin (MGM), bzw. von *L*-(*R*)-4-Cyclohexylprolin (CGM) anstelle von *L*-Prolin (GM) an der Position 8 in der Aminosäuresequenz. Diese kleine Variation führt zu einer Zunahme der metabolischen Stabilität von MGM bzw. CGM gegenüber Griselimycin.²⁷ Um einen tieferen Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu erhalten und die Anwendbarkeit der RDC-Methode von kleinen Molekülen auf kleine und mittlere Peptide zu erforschen, wurde MGM einer RDC-Analyse unterzogen. Dabei sollten vorrangig die folgenden Fragen geklärt werden:

- Sind die aus dem ROE-/MD-Ansatz generierten Konformere im Einklang mit den RDC-Ergebnissen?
- Wie unterscheiden sich RDC-Strukturen, ROE-Strukturen und die kombinierten Strukturen (ROE und RDC)?
- Wie flexibel ist das zyklische Rückgrat (Thr3, Leu4, Pro5, Leu6, Val7, Pro8, Leu9, Gly10) von MGM?
- Können Peptidstrukturen mittlerer Größenordnungen wie kleine organische Moleküle in der RDC-Analyse behandelt werden?



R = H [Griselimycin (GM)]
R = Me [Methylgriselimycin (MGM)]
R = Cyclohexyl [Cyclohexylgriselimycin (CGM)]

Abbildung 29: Chemische Struktur von Griselimycin (*L*-*N*-Methylvalin (acetyliert) (1), *L*-(*R*)-4-Methylprolin (2), *L*-*N*-Methylthreonin (3), *L*-Leucin (4), *L*-(*R*)-4-Methylprolin (5), *L*-Leucin (6), *L*-*N*-Methylvalin (7), *L*-Prolin (8), *D*-*N*-Methyl-*D*-Leucin (9), Glycin (10)) und Derivaten. Die Substitution des Protons an der Position 4 (γ) von Prolin 8 durch eine Methyl- oder Cyclohexylgruppe erhöht die metabolische Stabilität im Vergleich zu Griselimycin erheblich.²⁷

4.1.2. Methoden, Konformationsanalysen und verschiedene Strukturmodelle von MGM

Strukturaufklärung und ROE-Ensemble von MGM (LANNES/ KURZ)²⁸

In der NMR-Gruppe (Labor KURZ) von Sanofi in Frankfurt wurde die Konstitution von MGM mittels ^1H , ^{13}C , ^1H - ^1H -COSY, ^1H - ^{13}C -HSQC, ^1H - ^{13}C -HMBC, ^1H - ^1H -ROESY und ^1H - ^1H -TOCSY bestätigt und eine Konformationsanalyse im Rahmen einer Masterthesis von LANNES in CDCl_3 durchgeführt.²⁸ In Abbildung 30 ist das dreidimensionale Modell gezeigt. Dieses wurde mit dem Softwarepaket SYBYL⁸⁵ durch *constrained*-MD-Simulation und anschließender Energieminimierung unter Verwendung von 146 ROE-Kontakten (aus Tabelle 9, Kapitel 6.1) erzeugt. Im Laufe der MD-Simulation konnten weiterhin bis auf wenige Ausnahmen die Methylen- und Methylgruppen der Aminosäuren-Seitenketten anhand der entsprechenden ROE-Kontakte diastereotop zugeordnet werden, siehe dazu auch Tabelle 11 (im Kapitel 6.1). Die insgesamt zehn berechneten Konformere sind gut durch die experimentellen ROE-Daten definiert. Nur neun der insgesamt 146 ROEs zeigen eine Verletzung zwischen 0.2 und 0.6 Å auf. Der RMSD [Å] über alle Schweratome zwischen den überlagerten Konformeren liegt bei $0.64 \text{ Å} \pm 0.22 \text{ Å}$. Verwendet man bei der Überlagerung nur die Rückgrat Atome aus dem zyklischen Teil des Peptids, so liegt der RMSD bei unter 0.1 Å. Dies wurde dahin gehend interpretiert, dass der zyklische Teil des Peptids eher starr ist und die Seitenkette (acetyliertes Valin1 und Prolin2) eher flexibel ist. Vergleicht man die Standardabweichungen der Torsionswinkel ϕ , ψ , ω der einzelnen Konformere in Tabelle 10 (im Kapitel 6.1), so wird deutlich, dass sich vor allem der Bereich um die Gly10-O-Thr3-Verknüpfung leicht unterscheidet. Dieser Teil des Moleküls ist auch am schlechtesten durch die ROE-Daten beschrieben. Zusätzlich ist auch noch aus der Tabelle zu entnehmen, dass die Winkel ω für die *trans*- und die *cis*-Konformation der Peptidbindungen bei den Aminosäuren Leu6 bis Gly10 um bis zu 10° vom Idealwert von 180° bzw. 0° abweichen. Fasst man die strukturellen Merkmale aus dem ROE/MD-Ensembles zusammen, können folgende Charakteristika festgestellt werden:

- Die Peptidbindung zwischen der Aminosäure Val7 und Pro8 weist eine *cis*-Konformation auf.
- Aufgrund der Geometrie (Winkel N-H-O) und der geringen Abstände zwischen Gly10-NH und Leu6-Carbonyl bzw. Leu6-NH und Leu4-Carbonyl kann man von der Ausbildung von zwei intramolekularen Wasserstoffbrückenbindungen ausgehen.
- Das Leu4-NH ist an keiner Wasserstoffbrückenbindung beteiligt.

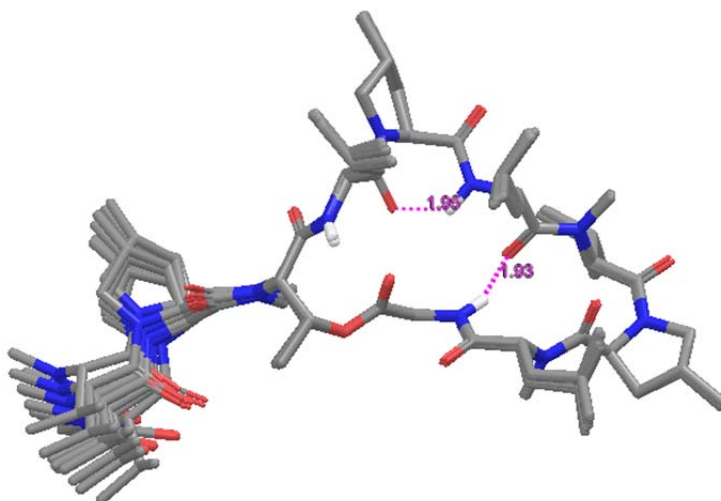


Abbildung 30: Konformerensemble von MGM bestehend aus 10 Strukturen. Der RMSD [Å] zwischen den Atomen der überlagerten Konformeren über alle Schweratome liegt bei $0.64 \text{ Å} \pm 0.22 \text{ Å}$. Die Distanzen der postulierten Wasserstoffbrückenbindung sind in violett in die Abbildung eingetragen.

RDC-Konformationsanalyse von MGM

Für die RDC-Analysen wurden im ersten Schritt die isotropen und anisotropen Proben präpariert. Dazu wurden für die isotropen Messungen 4 mg von MGM in 600 μl CDCl_3 gelöst, in ein NMR-Röhrchen überführt das anschließend abgeschmolzen wurde. Die anisotrope Probe wurde in einem chemisch quervernetzten PDMS-Gel (MOSKALENKO)²⁰⁰ ebenfalls in CDCl_3 angesetzt. Dieses quoll mehrere Wochen, bis sich eine konstante Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittelsignals einstellte. Anschließend wurden 6 mg MGM hinzugefügt und die Probe für weitere zwei Wochen bei konstanten 40°C im Trockenschrank gequollen. Dabei wurde darauf geachtet, dass der PDMS-Stick stets mit Lösungsmittel bedeckt ist. Nachdem sich die Probe in dem Stick homogen verteilt und Quadrupolaufspaltung wieder konstant ist (Abbildung 31) wurde zur Kontrolle ein Protonenspektrum der Probe aufgenommen (Abbildung 32). Erst danach wurde das NMR-Röhrchen versiegelt.

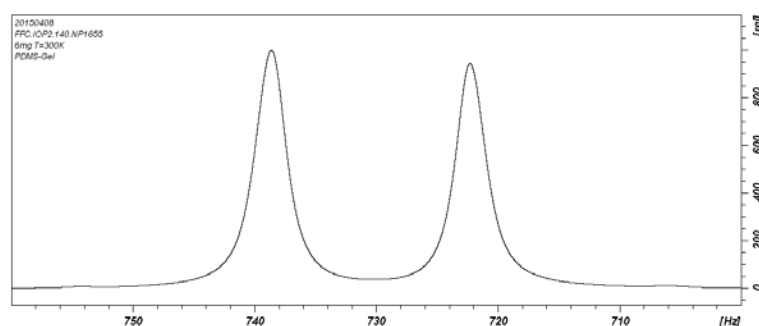


Abbildung 31: Quadrupolaufspaltung (16 Hz) des Lösungsmittelsignals im PDMS-Gel mit 6 mg MGM aufgenommen bei T= 300K.

Überlagert man das isotrope (blau) und das anisotrope (rot) Protonenspektrum von MGM so erkennt man, dass die Protonensignale auch im PDMS-Gel gut aufgelöst sind. Die Feinaufspaltungen sind in anisotroper Phase aber nicht mehr zu erkennen. Die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen in den isotropen und anisotropen Spektren sind nur geringfügig. Im PDMS-Gel sind deutlich die Polymerrestsignale zwischen -1 und +1 ppm sichtbar, die einige Signale der aliphatischen Peptidseitenketten überdecken.

Zusätzlich ist sowohl im isotropen als auch im anisotropen Spektrum bei einigen chemischen Verschiebungen eine Signalverdopplung zu beobachten. Besonders ist das bei den NHs von Leu4 (6.5ppm), Leu6 (7.8 ppm) und Gly10 (8.8ppm), aber auch bei den beiden Thr3 α (5.6 ppm) und β (5.9 ppm) sichtbar. Eine Erklärung dafür kann eine sehr langsame *cis-/trans*-Isomerisierung an den Peptidbindungen sein, an denen Pro2, Pro5 und Pro8 beteiligt sind. Zusätzlich kann in den ROE-Spektren sowohl in den Lösungsmitteln DMSO als auch CDCl_3 gezeigt worden, dass ebenfalls eine gehinderte Amid-Rotation zwischen der endständigen Acetylgruppe und der ersten Aminosäure in der peptidischen Seitenkette *L*-N-Methylvalin vorliegt. Beide Aspekte könnten eine Erklärung für die zweite sehr gering populierte Konformation sein (ca. 6 %). In der folgenden RDC-Analyse wird aber ausschließlich das zyklische Peptidrückgrat (Thr3, Leu4, Pro5, Leu6, Val7, Pro8, Leu9, Gly10) der Hauptkonformation untersucht. Die zweite gering populierte Konformation wird nicht berücksichtigt.

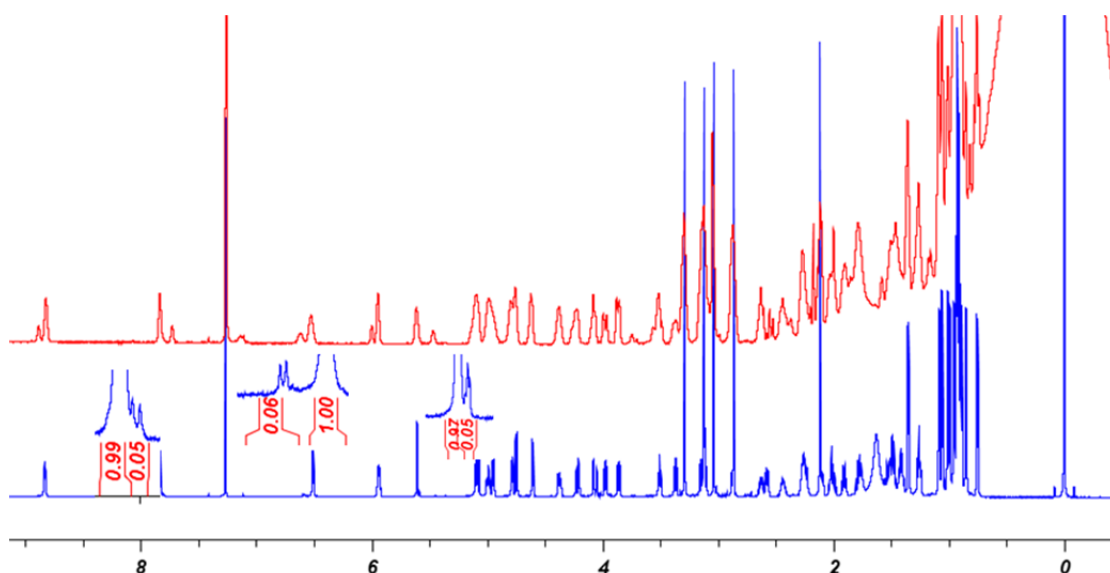








Abbildung 32: Überlagerung des isotropen (blau) mit dem anisotropen (rot) Protonenspektrum. Im isotropen und anisotropen Spektrum ist ein doppelter Signalsatz erkennbar.

Zur Bestimmung der heteronuklearen $^1J_{CH}$ ($^1J_{NH}$) und $^1T_{CH}$ ($^1T_{NH}$) Kopplungen wurden in F2-gekoppelte CLIP- und CLAP-HSQC-Experimenten mit einem INEPT-Delay von 145 Hz an einem Bruker Avance I 700 MHz Spektrometer, das mit einem CP-TXI-700S4 Probenkopf ausgestattet ist, aufgenommen.²⁰¹ Alle Messungen wurden bei 300 K durchgeführt. Insgesamt konnten 47 RDCs bestimmt und zugeordnet werden, siehe dazu auch Tabelle 12 und Abbildung 59 bzw. Abbildung 60 in Kapitel 6.1. Die für die folgenden Analysen verwendeten 16 experimentellen RDC-Werte des zyklischen Teils des Peptidrückgrats sind in Tabelle 4 dargestellt. Sie liegen im Bereich von -14.6 bis 12.5 Hz. Die RDCs der rotierbaren Seitenketten von Val7 und Leu4, 6 und 9 wurden nicht verwendet. Auch die RDCs der beiden *L-trans*-4-Methylproline 5 und 8 wurden zunächst ignoriert, da abschließend nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die beiden Fünfringe starr (*up* oder *down*-Konformation) oder aber flexibel (*twist*) sind.²⁰² Die entsprechende Auswertung dazu ist in Kapitel 6.1 in Tabelle 23 und Abbildung 62 gezeigt.

Tabelle 4: D_{CH} -RDCs (Hz) für MGM in PDMS/ $CDCl_3$ -Gel bei einer Quadrupolaufspaltung von $\nu_Q = 16$ Hz. Die RDCs der Methylgruppen wurden in die entsprechenden CC- bzw. NC-Kopplungen umgerechnet.¹³⁰ Für die XPLORE-Berechnungen wurden softwarebedingt reduzierte RDC-Werte verwendet, weil hier die gyromagnetischen Verhältnisse nicht berücksichtigt werden.

Aminosäure	Kopplung	Drestraints [Hz] RDC@hotFCHT	Drestraints [Hz] (XPLORE)
Thr3	CaHa	1.4	0.77
	CβHβ	12.5	4.76
	CγC _{Methyl}	-0.6	-0.32
Leu4	NH	-3.5	3.46
	CaHa	-1.4	-0.74
Pro5	CaHa	8.2	4.41
Leu6	NH	9.2	-9.16
	CaHa	-8.5	-4.60
Val7	N-Methyl	0.3	-0.31
	CaHa	-14.6	-7.87
Pro8	CaHa	8.3	4.47
Leu9	N-Methyl	-0.1	0.11
	CaHa	4.8	2.61
Gly10	NH	8.1	-8.13
	CaHa1	4.1	2.18
	CaHa2	9.9	5.36

Verwendet man die in Tabelle 4 angeführten RDCs mit der Software RDC@hotFCHT unter Verwendung der SCST-Methode (Abbildung 11) mit den zehn Strukturen aus der ROE-MD-Simulation (Abbildung 30), so passt keiner der Vorschläge zu den experimentell ermittelten RDCs. Im Durchschnitt liegen alle RDC-Kopplungen um ca. 5 Hz daneben, wobei der größte Fehler zwischen experimentellem und berechnetem RDC bei der Kopplung CaHa von Val7 liegt (14 Hz). Alle Strukturen weisen annähernd den gleichen RMSD-Wert auf. Die Alignment-Tensor-Komponenten sind wie zu erwarten bei allen zehn Berechnungen annähernd gleich. Exemplarisch hierfür sind die axialen bzw. die rhombischen Komponenten und der GDO in der Tabelle angefügt. Der Vollständigkeit wegen wurde auch der MCST-Fit mit allen zehn überlagerten Strukturen, siehe auch Abbildung 12, mit RDC@hotFCHT durchgeführt. Erwartungsgemäß liegt auch hier der Fit bei einem RMSD-Wert von ca. 5 Hz. An dieser Stelle sei hier noch kurz erwähnt, dass bei den meisten RDC-Analysen, die im Folgenden mit RDC@hotFCHT durchgeführt wurden, standardmäßig folgende Einstellungsparameter verwendet wurden:

 CalculateOnlyRDCs = 1	→	<0 1>	nutzt das RDC-Modul
 RDCSuperimposeConformers = 1	→	<0 1 2 3>	Ensembleanpassung, hier SCST & MCST
 RDCLongNumberFormat = 1	→	<0 1>	Höhere Zahl an Dezimalstellen
 RDCScaleWeightsWithDmax = 0	→	<0 1>	Automatische Gewichtung mit γ -Kern und r (Distanz)
 RDCPopulationstepsize = 10	→	<float>	Schrittweite der Abtastung (Population)
 Weighing factor w = 1.0	→		manuelle RDC-Gewichtungsfaktoren

Werden andere Programmparameter verwendet, wird explizit im Text darauf hingewiesen. Alle Bedeutungen und Erklärungen zu einzelnen Parametern können aus der Dissertation von SCHMIDTS entnommen werden.⁷⁹

Tabelle 5: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen mit RDC@hotFCHT. Die Konformere R100-R950 entsprechen den in der Abbildung 30 gezeigten Strukturen (best-fit R600= 0.678).

Konformer	RMSD [Hz]	Q-Faktor	Aa [E-03]	Ar [E-04]	GDO [E-03]
R100	5.05	0.68	1.09	3.56	1.13
R350	5.731	0.723	0.907	4.66	0.992
R400	5.073	0.683	1.09	3.76	1.14
R500	5.051	0.68	1.14	3.67	1.18
R600	5.037	0.678	1.12	3.52	1.16
R650	5.038	0.679	1.12	3.22	1.16
R700	5.058	0.681	1.14	3.84	1.18
R800	5.177	0.697	0.977	4.24	1.04
R900	5.197	0.7	0.963	4.22	1.03
R950	5.078	0.684	1.14	4.15	1.19

Das anhand der ROE-Kontakte erzeugte Strukturbündel scheint also ungeeignet, die RDCs zu beschreiben. Das könnte darauf hinweisen, dass entweder Flexibilität vorliegt (ROEs und RDCs beschreiben unterschiedliche Zeitskalen) oder auch dass das Molekül durch die Verwendung von 146 ROE-Kontakte zu sehr eingeschränkt (festgezurrt) wird („overrestraining“). Um zu neuen Strukturmodellen zu gelangen, wurden in einem zweiten Ansatz neue Strukturen von MGM mit dem *conformational-search*-Modul der Software Maestro-Schrödinger-Suite 2012⁸⁷ erzeugt. Bei diesem Suchlauf wurden keine ROE-restraints verwendet. Als Startstruktur wurde das Konformere R100 aus

der ursprünglichen ROE/MD-Analyse verwendet. Dabei wurde die Suchmethode Mixed-torsional/Low-mode-sampling in Kombination mit dem Kraftfeld OPLS_2005⁸⁸ (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*), eine für Peptide erweiterte Version des bereits etablierten Standardkraftfeldes OPLS-AA^{203,204} (All-Atom), verwendet. Die ausgewählte Suchmethode kombiniert die Stärken aus der MCMM (Monte-Carlo-Multiple-Minimum) und LMOD (Low-Mode and Large-Scale-Low-Mode) Methode, indem sie hier bei der Suche einige Schritte nach LMOD und andere nach MCMM im Verhältnis 50/50 durchführt.⁹⁰ Alle verwendeten Einstellungsparameter sind in Abbildung 61 im Kapitel 6.1 gezeigt. Insgesamt wurden 165 Strukturen generiert, die alle in einem ähnlichen energetischen Bereich von 377 bis 398 kJ/mol liegen. Daher wurden keine Strukturen anhand der Energiewerte selektiert. Beim visuellen Abgleich der einzelnen Strukturen ist zu erkennen, dass vor allem im Bereich von MePro8 und der Esterbindung zwischen Gly10 und Thr3 Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen vorliegen. Die strukturellen Merkmale (*cis*-Peptidbindung zwischen Val7 und MePro8 und die beiden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Gly10-NH und Leu6-Carbonyl- bzw. Leu6-NH zur Leu4-Carbonyl-Gruppe) bleiben erhalten. Im Vergleich zu den ROE/MD-Strukturen aus Abbildung 30 ist jedoch erwartungsgemäß wesentlich mehr strukturelle Vielfalt vorhanden. Man könnte somit vor allem im Bereich von MePro8 und der Esterbindung zwischen Gly10 und Thr3 Dynamik erwarten. Überlagert man die Strukturen anhand ihres zyklischen Rückgrats (Abbildung 33), als Referenz wird die Struktur mit der niedrigsten relativen Energie (377 kJ/mol) verwendet, so kann man die Unterschiede auch in den unterschiedlichen RMSD-Werten [Å] der einzelnen Strukturen erkennen. Die erzeugten Molekül Geometrien lassen sich grob in fünf Cluster unterteilen (siehe auch Kapitel 6.1, Tabelle 13):

- Abweichungen 0 bis 0.1 Å von der Referenzstruktur (27 Strukturen),
- Abweichungen von 0.1 bis 0.2 Å von der Referenzstruktur (38 Strukturen),
- Abweichungen von 0.2 bis 0.3 Å von der Referenzstruktur (63 Strukturen),
- Abweichungen von 0.3 bis 0.4 Å von der Referenzstruktur (23 Strukturen) und
- Abweichungen größer 0.4 Å von der Referenzstruktur (14 Strukturen).

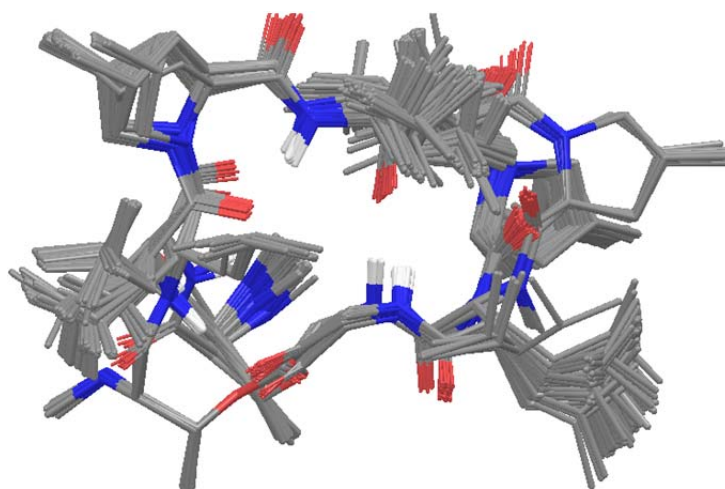


Abbildung 33: Überlagerung der 165 generierten MGM-Strukturen anhand des zyklischen Teils des Peptidrückgrats (*conformational*-serach, Maestro-Schrödinger). Die Seitenkette (acetyliertes-MeVal1 und MePro2) wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt.

Im nächsten Schritt wurden die in Tabelle 4 bestimmten RDCs auf Konsistenz mit einigen der neu generierten Strukturen geprüft. Dabei wurden aus jedem der fünf definierten Cluster mehrere Strukturen ausgewählt. Für die Berechnungen wurde wieder zunächst die SCST-Methode der Software *RDC@hotFCHT* verwendet. Wie in Tabelle 6 zu sehen ist, sind die RMSDs der betrachteten Strukturen schlecht. Zwar weisen sie aufgrund der verschiedenen geometrischen Strukturen mehr strukturelle Vielfalt als bei den ROE/MD-Strukturen auf, jedoch wird keine gut durch die experimentellen RDC-Daten beschrieben. Bei einigen Kopplungen beträgt die Differenz zwischen experimentellem und berechnetem RDC-Wert mehr als 20 Hz. Auch der MCST-Fit-Ansatz führte nicht zum gewünschten Erfolg. Bei verschiedenen Kombinationen von Strukturen aus den fünf Clustern kann kein Ensemble gefunden werden, welches die experimentellen RDCs gut erfüllt. Das beste gefundene Ensemble (40% conf26 und 60% conf68) hat einen Q-Faktor von 0.69 (RMSD= 5.1 Hz). Die Alignment-Tensor-Komponenten der mit *RDC@hotFCHT* getesteten Strukturen haben sich im Vergleich zu den ROE/MD-Strukturen nicht wesentlich verändert (Tabelle 6) und sind in der gleichen Größenordnung wie jene aus Tabelle 5. Schaut man sich die Torsionswinkel ω der einzelnen zyklischen Aminosäuren an, so ist besonders auffällig, dass sie auch hier zum Teil deutlich vom formalen Wert $\pm 180^\circ$ (*trans*) bzw. 0° (*cis*) abweichen, siehe auch Tabelle 14 in Kapitel 6.1. Zwar sind kleine Abweichungen nichts Ungewöhnliches weil Peptidbindungen nicht immer planar sind, sondern auch leicht in sich verdreht sein können, jedoch sind bei einigen Strukturen Winkelabweichungen von mehr als 15° vorhanden. Abschließend sei noch gesagt, dass Aufgrund der geringen Erfolgsaussichten darauf verzichtet wurde, die restlichen generierten Strukturen auf die Kompatibilität mit den RDC-Daten zu überprüfen, da die meisten sich innerhalb der vorab definierten strukturellen Clusters befinden (siehe Abbildung 33 und Clusterdefinition auf der Seite 52).

Tabelle 6: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen mit RDC@*hotFCHT*. Die Konformere entsprechen einer Auswahl der in Abbildung 33 gezeigten Strukturen. Der RMSD-Wert [Å] bezieht sich auf die Güte der Überlagerung des zyklischen Rückgrats. Als Referenzstruktur wurde das Konformer 1 gewählt.

Konformer	RMSD [Å]	Pot. Energie [kJ/mol]	RMSD [Hz]	Q-Faktor	Aa [E-04]	Ar [E-04]	GDO [E-04]
Conf1		377.2	7.139	0.962	9.074	4.436	9.854
Conf2	0.22	377.3	6.751	0.909	8.228	3.592	8.796
Conf6	0.29	378.7	6.437	0.867	8.062	3.162	8.515
Conf26	1.43	382.8	6.383	0.860	7.850	3.052	8.283
Conf28	0.28	383.2	6.520	0.878	7.649	2.581	7.969
Conf34	0.23	384.4	5.572	0.750	7.503	1.760	7.657
Conf50	0.11	385.9	6.709	0.904	8.841	3.330	9.299
Conf54	0.3	386.1	7.034	0.947	8.583	3.590	9.129
Conf60	0.20	386.8	6.975	0.939	7.879	2.773	8.236
Conf68	0.06	387.6	6.021	0.811	7.620	3.064	8.069
Conf73	0.25	388.5	6.024	0.811	7.753	3.076	8.198
Conf77	0.36	388.8	6.415	0.864	7.238	2.646	7.592
Conf83	0.24	389.6	6.149	0.828	7.539	2.555	7.857
Conf87	0.27	390.0	6.942	0.935	7.713	2.509	8.013
Conf92	0.19	390.3	5.499	0.741	7.106	1.905	7.295
Conf94	0.11	390.5	6.012	0.810	7.677	3.047	8.118
Conf98	0.32	390.9	6.013	0.810	7.649	2.970	8.070
Conf101	0.09	391.1	7.131	0.960	8.176	2.850	8.541
Conf127	0.03	392.7	6.592	0.888	7.910	2.252	8.146
Conf137	0.51	394.1	6.508	0.877	7.444	2.134	7.670
Conf154	1.49	396.6	6.906	0.930	7.760	2.549	8.068

Constrained-MD mit XPLOR-NIH

Da mit den bisher beschriebenen ROE-/ MD- bzw. den *constraint* freien MM-Methoden keine geeigneten Strukturvorschläge erzeugt werden konnten, die im Einklang mit den experimentellen RDC-Daten waren, wurden im Folgenden verschiedene Strukturberechnungen von THIELE mit dem Softwarepaket XPLOR-NIH^{93,94} durchgeführt. Dieses hat den Vorteil, dass neben den ROE- auch die RDC-restraints bereits bei der Strukturgenerierung berücksichtigt werden können. Bevor die XPLOR-RDCs, siehe Tabelle 4 rechte Spalte, jedoch mit in der Simulation berücksichtigt wurden, ist in Vorabversuchen getestet worden, welchen Einfluss die verschiedenen ROE-Distanzen (ROEs zu flexiblen Seitenketten (Leu4, Leu6, Val7, Leu9), ROEs zu den beiden MePro 5 und 8, ROEs zu den N-Methylgruppen, ROEs der peptidischen Seitenkette (Ac-MePro2, AcVal1) und weitreichende ROEs von größer als 5 Å auf die entsprechenden berechneten Strukturen haben.

Verwendet man alle ermittelten ROE-Distanzen aus Tabelle 9 (**RUN317**) bei der Simulation (es wurden standardmäßig immer 96 Strukturen generiert), so erhält man relativ starre Strukturbündel welche man grob in drei Energiecluster (335 bis 392 kcal/mol, 804 bis 1269 kcal/mol und 1507 bis 1620 kcal/mol) einteilen kann. Die Hauptunterschiede der einzelnen Cluster sind bei den beiden MePro5 und 8 und zwischen den Aminosäuren Gly10 und Thr3 zu erkennen. Betrachtet man die Anteile der einzelnen Energietermine (E_{bonds} , E_{angles} , E_{improper} , E_{vdw} , E_{Noe}) an der Gesamtenergie (E_{overall}) der Strukturen, so ist auffällig, dass ein großer Anteil auf die Abstandsbeschränkungen E_{Noe} entfällt. Während E_{Noe} im ersten Cluster bei etwa 161 bis 196 kcal/mol liegt, steigt er im zweiten Cluster auf etwa 407 bis 661 kcal/mol und schließlich im dritten Cluster auf 788 bis 965 kcal/mol an, siehe dazu auch Abbildung 35.

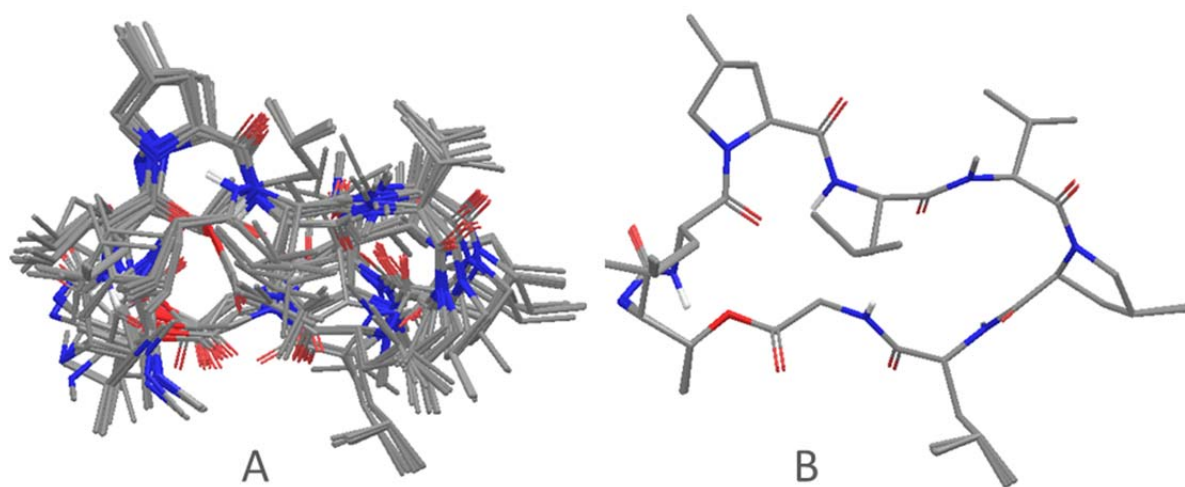


Abbildung 34: Strukturüberlagerung von **RUN317** des zyklischen Teils des Peptids anhand der Schweratome des Rückgrats. Die flexible Seitenkette wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Die berechneten 96 Strukturen (A) sind eher gruppiert und weisen Cluster auf. Auf der rechten Abbildung (B) sind die 20 überlagerten Strukturen mit den niedrigsten Energien angezeigt. Auch hier liegt die Vermutung eines „overrestraining“ durch die Verwendung der 146 ROE-Kontakte vor.

Überlagert man alle 96 Strukturen anhand der Backbone-Atome (nur der zyklische Teil) und berechnet den RMSD [Å] anhand einer Referenzstruktur (hier wurde die energieärmste Struktur als Referenz verwendet), so kann man vier diskrete Cluster in einem sehr eng definierten Bereich identifizieren. Die RMSD-Abweichung des Peptidrückgrats sind hierbei alle ≤ 0.05 Å. Auch hier liegt die Vermutung eines „overrestraining“ durch die Verwendung der 146 ROE-Kontakte nahe.

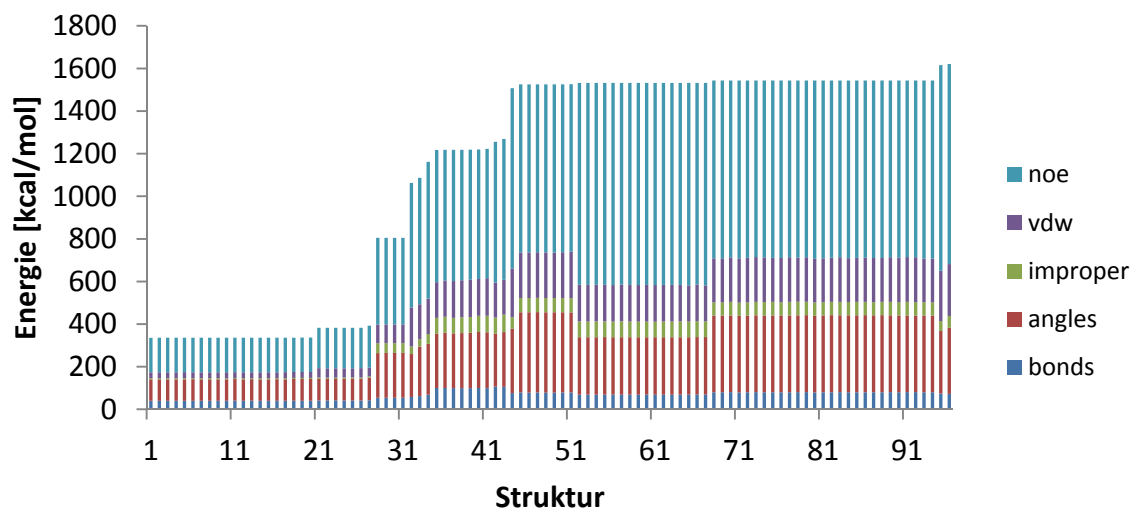


Abbildung 35: Energieterne und Gesamtenergie der 96 berechneten Strukturen (**RUN317**), welche mit allen ermittelten ROE-restraints berechnet wurden. In der Farbe Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Rot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.

Vergleicht man die ROE-Abstandsverletzungen der Strukturen im Einzelnen, so liegen viele im Bereich von 0.2 bis 0.4 Å und sind somit im Rahmen des experimentellen Fehlers. Auffällig ist, dass die größeren Abstandsverletzungen > 0.4 Å vor allem bei flexiblen Seitenketten auftreten. Einige der weitreichenden ROE-Werte > 5 Å sind auch mit deutlich größeren Fehlern behaftet. Im Durchschnitt sind das pro Struktur etwa 5 bis 20 Abstandsverletzungen die größer als 0.4 Å sind und somit einen entscheidenden Beitrag zu den hohen E_{NOE} -Energieterne beitragen.

Aufgrund der Vermutung des „overrestraining“ und der damit verbundenen Abstandsverletzungen aus dem **RUN317** wurde die gleiche Analyse jetzt mit einem auf 40 ROE-reduzierten Datensatz (**RUN420a**, ohne die Berücksichtigung der ROEs zu den flexiblen Seitenketten und weitreichenden Distanzen) durchgeführt. Die berechneten Strukturen wiesen nun erwartungsgemäß eine deutlich geringere Gesamtenergie im Bereich von nur noch 49.0 bis 149.9 kcal/mol auf, wobei sich vor allem der energetische Anteil der Abstandsbeschränkung von E_{Noe} auf 19 bis 71 kcal/mol reduzierte. Insgesamt liegen nur wenige Abstandsverletzungen vor, von denen die allermeisten kleiner als 0.4 Å sind. Lediglich die LEU6-H α →GLY10-HN-Abstände sind in einigen der Strukturen um etwa 0.4 Å verletzt.

Überlagert man die Strukturen aus **RUN420a** anhand ihres zyklischen Rückgrats, so ist aufgrund der geringeren Anzahl an restraints wie zu erwarten eine deutlich größere strukturelle Vielfalt im Vergleich zu den Strukturen, welche mit allen ROE-Kontakten ermittelt wurden, sichtbar. Die einzelnen Strukturen sind nicht mehr in Cluster gruppiert sondern bilden eher ein Kontinuum aus, Abbildung 36 (A). Auf der rechten Bildhälfte (B) sind die zwanzig Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt. Größere flexible Bereiche sind vor allem bei MePro5 und 8 sichtbar.

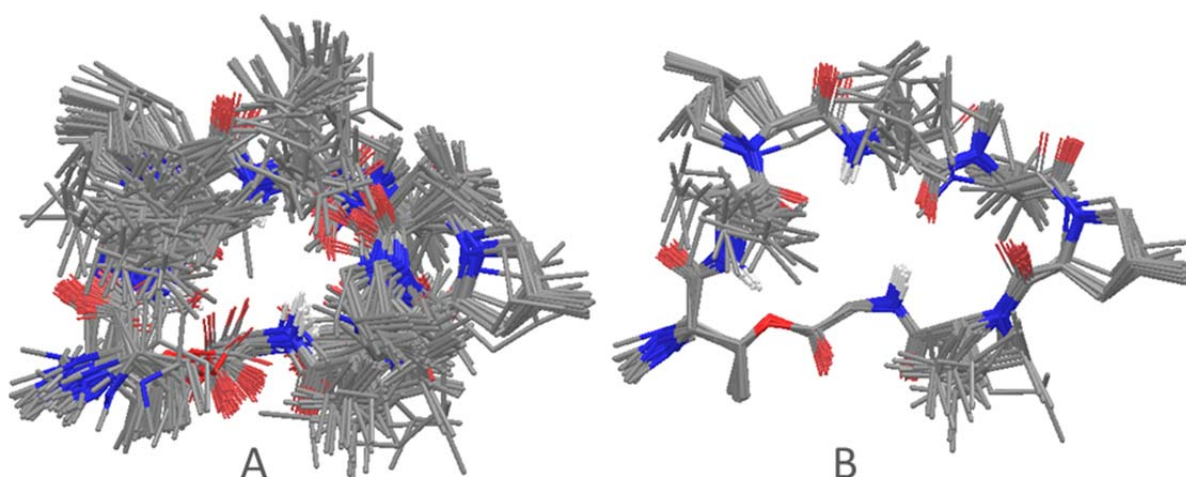


Abbildung 36: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (**RUN420a**). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Bei der Berechnung mit XPLOR-NIH wurden 40 ROEs verwendet. Im Vergleich zu den Strukturen welche mit 146 ROE-Kontakten bestimmt wurden sind diese hier nicht in einzelne Cluster gruppiert sondern weisen eher ein Kontinuum auf (A). In Abbildung B sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.

Überlagert man alle 96 Strukturen anhand der zyklischen Backbone-Schweratome und berechnet den RMSD [\AA] anhand einer Referenzstruktur (hier wurde die energieärmste Struktur als Referenz verwendet), so liegen diese zwischen 0.06 und 2 \AA . Auch die Überlagerung der zwanzig energieärmsten Strukturen ergibt ein Kontinuum an Strukturen im Bereich von 0.06 und 0.6 \AA .

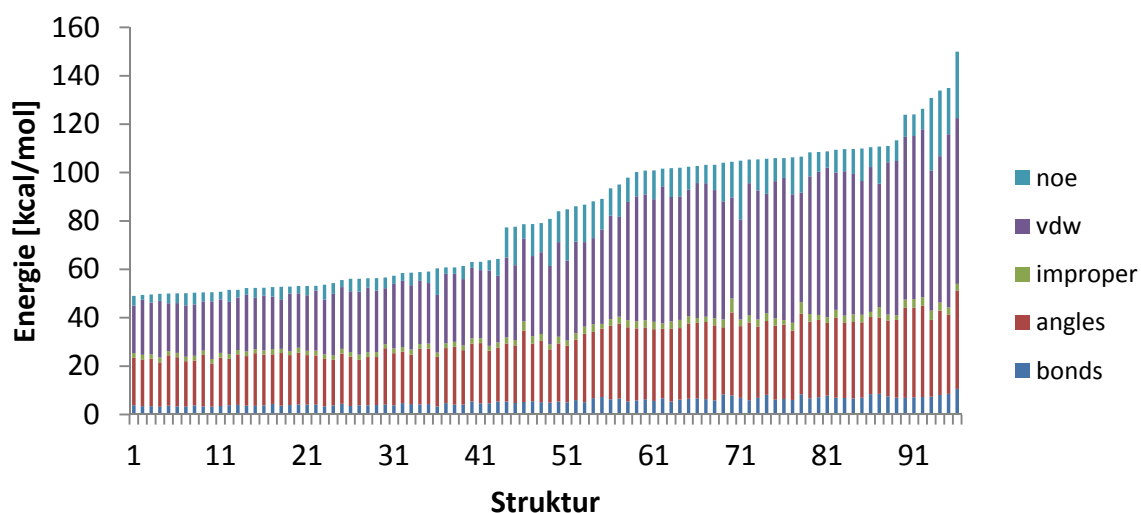


Abbildung 37: Energien der aus **RUN420a** berechneten Strukturen. In der Farbe Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Rot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.

Die nun folgenden XPLOR-Analysen mit der Verwendung der zusätzlichen 16 RDC-restraints aus Tabelle 4 wurden wie die ROE-Analysen zuvor einmal in Kombination mit allen ROE-Werten (**RUN320**) und ein zweites Mal mit dem reduzierten ROE-Datensatz durchgeführt (**RUN420b**). Der Vollständigkeit wegen sei hier noch erwähnt, dass auch Konformationsstudien auf der Basis der 16 RDC-Werte alleine durchgeführt wurden. Da diese Rechnungen aber aufgrund der wenigen verwendeten RDC-Daten sehr diverse Strukturen bei ähnlicher (Pseudo) Energie lieferten, sodass eine Selektion von einzelnen Strukturen nicht sinnvoll war, wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt.

Beim **RUN320** (alle ROEs und RDCs) sind hohe Gesamtenergien (von 371 bis 1813 kcal/mol) mit einem großen Anteil an E_{Noe} (162 bis 1090 kcal/mol) vorhanden. Die Gesamtenergien sind aufgrund des zusätzlichen Energieterms etwas höher als bei **RUN317** (alle ROEs) und sehr viel Größer als bei **RUN420a** (reduzierter ROE-Datensatz). Auch die ROE-Verletzungen sind etwas größer als bei den vorangegangenen Berechnungen (**RUN317/ RUN420a**). Die größten Abstandsverletzungen liegen zum Teil bei 1.5 Å und mehr, vor allem bei den flexiblen Seitenketten und teilweise auch bei den HN-Gruppen. Damit einhergehend sind die hohen E_{Noe} -Energiebeiträge von bis zu 113 kcal/mol bei einzelnen Abstandsverletzungen. Gruppiert man die Strukturen anhand ihres zyklischen Peptidrückgrats, so ist auch hier ein Strukturbündel mit feinen Abstufungen erkennbar.

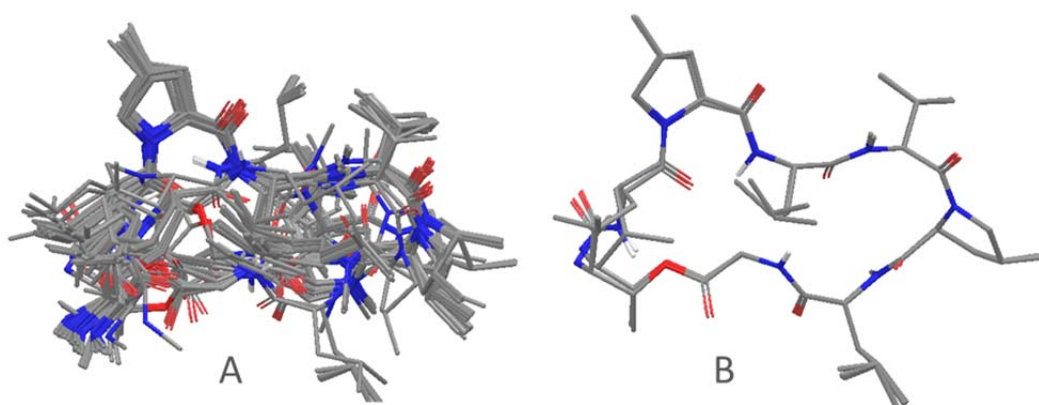


Abbildung 38: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (**RUN320**). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. Bei der Berechnung wurden alle ROE- und 16 RDC-restraints verwendet. Die Strukturen bilden auch hier keinen kontinuierlichen Übergang. In Abbildung B sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.

Überlagert man alle 96 Strukturen anhand der zyklischen Rückgrat-Schweratome und berechnet den RMSD [Å] anhand einer Referenzstruktur (hier wurde die energieärmste Struktur als Referenz verwendet), so liegen diese eher gruppiert vor und bilden keinen kontinuierlichen Übergang wie bei **RUN420a** (reduzierte ROE-Satz). Auch hier liegt die Vermutung eines „overrestraining“ vor. Bei der Überlagerung der zwanzig energieärmsten Strukturen gibt es zwei definierte Strukturbündel, eins im Bereich von 0.01 Å und ein zweites bei 0.17 bis 0.18 Å. Diese beiden unterscheiden sich hauptsächlich im Bereich von Thr3. Den Unterschied kann man auch visuell in Abbildung 38 B erkennen.

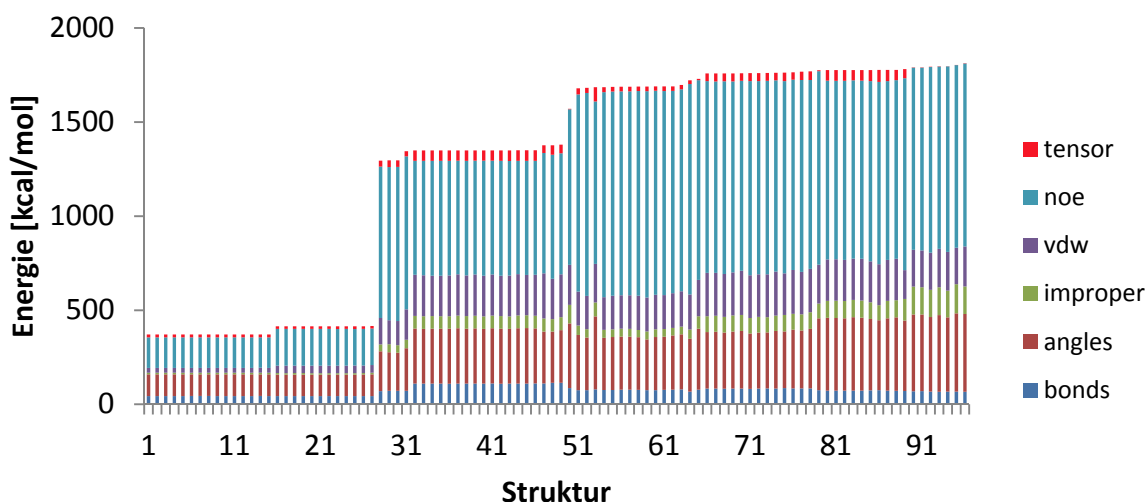


Abbildung 39: Energien der im **RUN320** generierten Strukturen, welche mit allen ROE- und 16 RDC-restraints erzeugt wurden. In der Farbe Rot ist der Tensor-, in Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Dunkelrot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.

Betrachtet man die RMSD-Werte der experimentellen und berechneten RDC-Wertepaare, so liegen diese im Bereich von 0.18 und 2.17 Hz, siehe auch Abbildung 40. Die Strukturen mit den geringsten Energiewerten haben allesamt einen RDC-RMSD-Wert von ungefähr 1 Hz und im Vergleich die etwas geringeren ROE-Abstandsverletzungen. Die Strukturen mit den geringsten RMSD-Werten (Strukturen 90-96) sind alle hochenergetisch und zeigen große ROE-Abstandsverletzungen auf, siehe auch Abbildung 39.

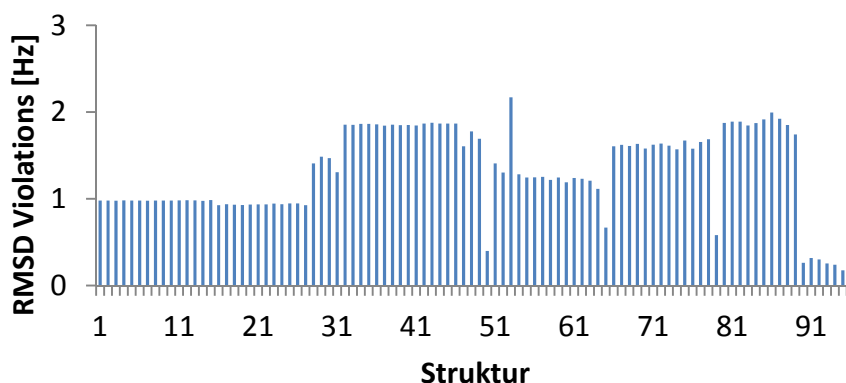


Abbildung 40: Berechnete RMSD-Werte ($D_{exp} \rightarrow D_{calc}$) aus **RUN320**. Die Werte liegen zwischen $RMSD_{(min)} = 0.18$ Hz und $RDC_{(max)} = 2.4$ Hz.

Aufgrund der großen E_{Noe} -Werte und der vielen ROE-Abstandsverletzungen im **RUN320** wurde die Analyse mit dem reduzierten ROE-Datensatz in Kombination mit den 16 Rückgrat-RDCs wiederholt (**RUN420b**). Die 96 Strukturen zeigen geringe Gesamtenergien von 67 bis 305 kcal/mol. Die E_{Noe} -Terme haben sich im Vergleich zu **RUN320** auf 5- 105 kcal/mol minimiert. Betrachtet man die einzelnen ROE-Abstandsverletzungen der Strukturen so sind die meisten kleiner als 0.4 Å, siehe

Tabelle 19. Lediglich einige Abstände von und zu HN-Protonen sind wieder in einigen der Strukturen um etwa 0.4 Å verletzt, ähnlich wie auch beim **RUN317**.

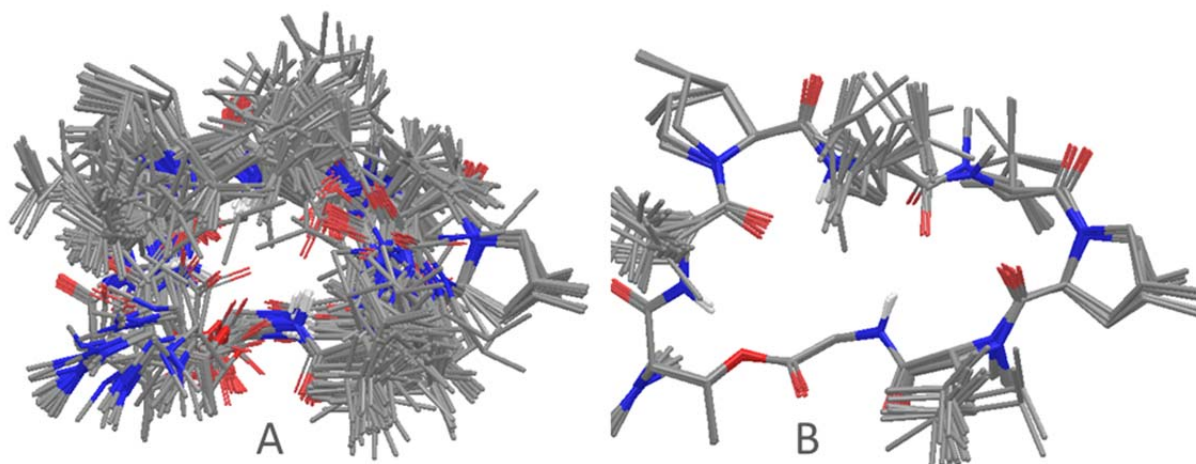


Abbildung 41: Strukturüberlagerung des zyklischen Teils des Peptids anhand des Rückgrats (**RUN420b**, reduzierter ROE-Satz, 16 RDCs, 96 Strukturen). Die flexible Seitenkette des Peptids wird der Übersichtlichkeit wegen nicht mit angezeigt. In der rechten Bildhälfte (B) sind die 20 Strukturen mit der niedrigsten Energie gezeigt.

Bei der Überlagerung der Strukturen anhand ihres zyklischen Peptidrückgrats erkennt man, dass sie eher wieder wie in **RUN420a** ein Kontinuum ausbilden und nicht sonderlich stark gruppiert sind. Die 96 Strukturen liegen im RMSD-Bereich von 0.01 und 2.4 Å. Bei den zwanzig energieärmsten Strukturen gibt es zwei definierte Strukturbündel, eins im Bereich von kleiner 0.1 Å und ein zweites bei etwa 0.2 Å. Diese beiden unterscheiden sich hauptsächlich im Bereich von Leu6 und Val7. Den Unterschied kann man auch visuell in Abbildung 41 B erkennen.

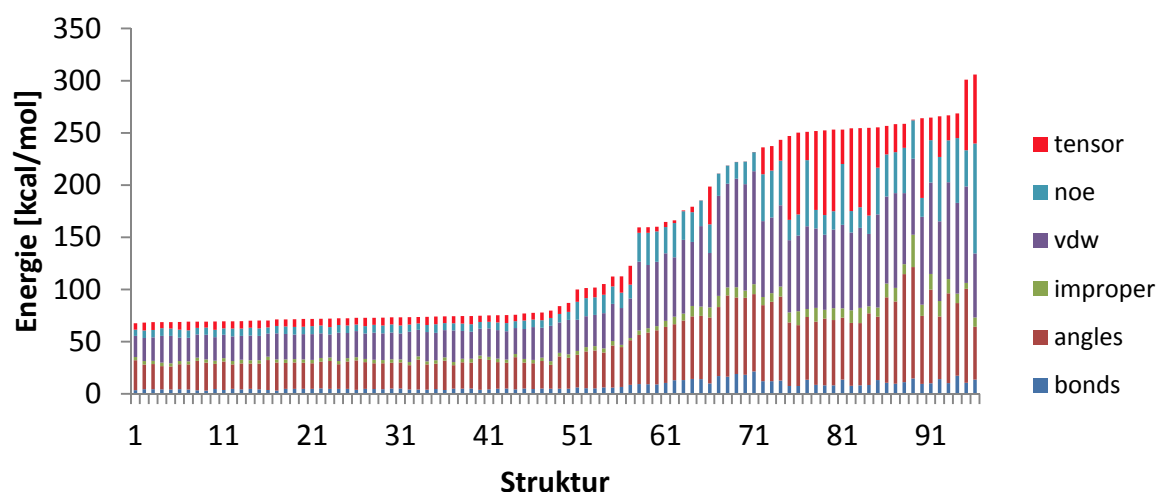


Abbildung 42: Energien der im **RUN420b** generierten Strukturen, welche mit 40 ROE- und 16 RDC-restraints erzeugt wurden. In der Farbe Rot ist der Tensor-, in Türkis ist der NOE-, in Violett der Van der Waals-, in Grün der Improper-, in Dunkelrot der Winkel- und in Blau der Bindungsanteil (alle in kcal/mol) dargestellt.

Der durch die RDC-Daten zusätzlich eingebrachte Energieterm E_{Tensor} liegt zwischen annähernd 0 und bei den hochenergetischen Strukturen bei bis zu 80 kcal/ mol. Die berechneten RMSD-Werte für die RDC-Verletzungen liegen zwischen $\text{RMSD}_{\text{min}} = 0.1$ Hz und $\text{RMSD}_{\text{RDC}_{\text{max}}} = 2.3$ Hz, siehe Abbildung 43, wobei die Strukturen mit sehr geringen RDC-RMSD-Werten wieder hohe Gesamtenergien (vor allem E_{angles} und E_{vdw}) aufweisen, siehe Abbildung 42. Die 50 energieärmsten Strukturen zeigen alle Werte um etwa 0.6 Hz auf.

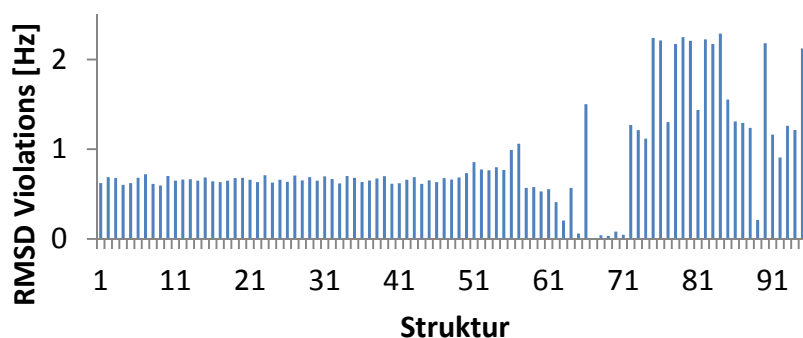


Abbildung 43: RMSD-Werte berechnet aus den ausgegebenen Daten der XPLOR-violation-files (**RUN420b**). Die Werte liegen zwischen $\text{RMSD}(\text{min}) = 0.01$ Hz und $\text{RMSD}(\text{max}) = 2.3$ Hz.

Um die im **RUN420b** ermittelten Strukturen gegen die experimentellen Daten zu validieren, wurden diese mit RDC@hotFCHT zurück gerechnet. Als Kriterium wurden diejenigen Strukturen mit den geringsten Energien E_{overall} ausgewählt. Insgesamt wurden 20 Strukturen mit der SCST-Methode getestet. Berücksichtigt man die unterschiedlichen Größenordnungen bei der Eingabe der RDC-Kopplungen bei RDC@hotFCHT im Vergleich zu XPLOR-NIH (siehe auch Tabelle 4), so liegen die ermittelten RMSD-Werte hier proportional etwas höher. Insgesamt bewegen sich die RMSD-Werte hier bei den zurück gerechneten Strukturen im Bereich von 1.2 bis 1.5 Hz, siehe auch Abbildung 45. Trägt man die einzelnen Wertepaare D_{exp} und D_{calc} der 16 RDCs in einem Diagramm gegeneinander auf, so erkennt man die Abweichungen der einzelnen experimentellen versus berechneten Kopplungen in den verschiedenen Strukturen, siehe Abbildung 44. Die Fehlerbalken beschreiben die experimentellen Fehler auf der Abszisse und die Standardabweichungen über alle 20 Strukturen auf der Ordinate. Vor allem die Kopplung CaHa1 bei der Aminosäure Gly10 weicht etwas vom experimentellen Wert ab (4.05/ 7.41 Hz). Die rückgerechneten Strukturvorschläge sind im Einklang mit den experimentellen Daten. Weil die RMSD-Werte der verschiedenen Strukturen sich nicht signifikant unterscheiden, kann mit den verwendeten 16 RDCs keine eindeutige Aussage getroffen werden, welche Struktur nun besser oder schlechter zu den experimentellen Daten passt. Der durchschnittliche RMSD-Wert über alle 20 Strukturen hinweg liegt bei 1.4 Hz (± 0.1 Hz). Eine lineare Regression über alle Datenpunkte ergibt ein Bestimmtheitsmaß von 0.9694.

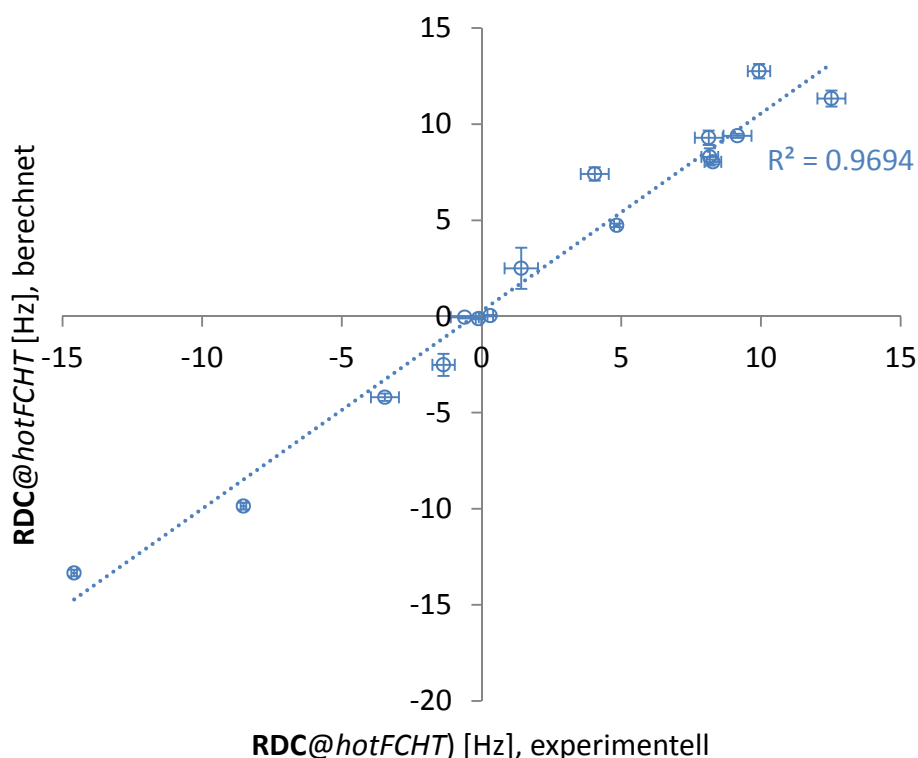


Abbildung 44: Korrelationen zwischen experimentellen und berechneten RDCs (Mittelwert) mit der Software *RDC@hotFCHT*. Dazu wurden die 20 besten energetischen Strukturvorschläge aus **RUN420b** verwendet. Die experimentellen Fehler sind auf der Abszisse und die Standardabweichungen der berechneten RDC-Werte auf der Ordinate durch die entsprechenden Fehlerbalken angezeigt.

Testet man die oben erwähnten 20 energieärmsten Strukturen aus **RUN420b** mit *RDC@hotFCHT* unter Berücksichtigung der γ - und δ -RDCs von MePro5, es werden also jetzt 20 anstatt der bisherigen 16 RDC-Werte bei der Analyse verwendet, so findet man bei drei Strukturen (5 (1.7 Hz), 51 (1.5 Hz), 84 (1.6 Hz)) die beste Übereinstimmung zwischen experimentellen und berechneten RMSD-Werten. Diese drei weisen auch in Abbildung 44 unter der Verwendung von lediglich 16 RDCs sehr gute RMSD-Werte auf (ca. 1.4 Hz). Diese Strukturen haben gemeinsam, dass sich der Prolinring an der Position 5 nur in der *down*-Konformation befindet.²⁰² Alle anderen 17 Strukturen, die mit 16 RDCs ebenfalls einen guten Fit ergaben, zeigen unter Verwendung von 20 RDCs zum Teil deutlich schlechtere Fits (2.1 bis 5.1 Hz). Besonders schlechte Fits haben dabei die Strukturen, bei denen sich der Prolinring 5 in der *up*-Position befindet (Struktur 4 (4.9 Hz), 78 (5.1 Hz), 14 (5.1 Hz), 13 (4.9 Hz). Verwendet man zusätzlich die RDC-Werte von MePro8 bei der *RDC@hotFCHT* Analyse, insgesamt werden hier nun 23 RDC-Werte genutzt, so zeigen die beiden Strukturen 5 und 51 mit je etwa 1.9 Hz den besten RMSD-Fit. Auch bei diesen beiden Strukturen befindet sich der Prolinring an der Position 8 in der *down*-Konformation. Der RMSD-Wert der Struktur 84, welcher noch unter Verwendung von 20 RDCs einen guten Fit ergab, verschlechtert sich hier auf 2.4 Hz. Hier befindet sich der Prolinring an der Position 8 in der *up*-Konformation.

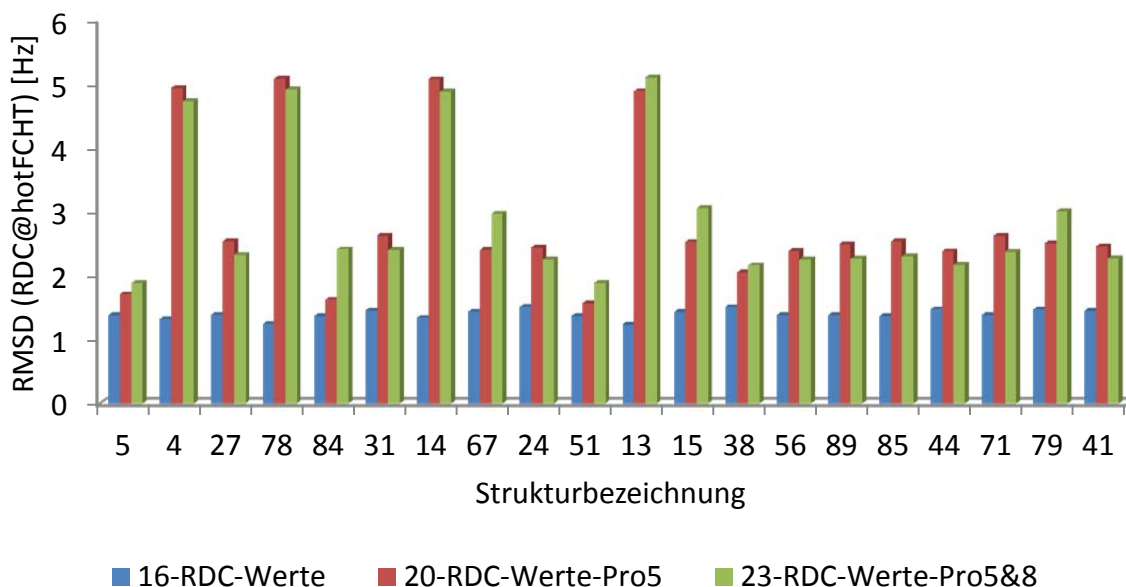


Abbildung 45: Graphische Darstellung der mit $RDC@hotFCHT$ ermittelten RMSD-Werte. Dabei wurden die 20 energieärmsten Strukturen aus der Analyse **420b** berücksichtigt. Die RMSD-Werte, welche mit 16 RDC-Kopplungen ermittelt wurden sind in blau, mit 20 rot und mit 23 grün angezeigt.

Trägt man die einzelnen Wertepaare D_{exp} und D_{calc} der 23 RDCs in einem Diagramm gegeneinander auf, so erkennt man auch hier die Abweichungen der einzelnen experimentellen versus der berechneten Kopplungen der beiden Strukturen (5 und 51). Eine lineare Regression über alle Datenpunkte hinweg ergibt ein ähnlich gutes Bestimmtheitsmaß wie bei der Verwendung von 16 RDC-Werten (Abbildung 44). Größere Abweichungen sind bei der $C\alpha H\alpha 1$ von Gly10 (4.05 Hz / 7.41 bzw. 7.85 Hz), $C\delta H\delta 2$ von Pro8 (8.59 Hz/ 4.46 Hz bzw. 5.23 Hz) und $C\gamma H\gamma 1$ von Pro8 (12.82 Hz/ 17.29 Hz bzw. 17.28 Hz) erkennbar.

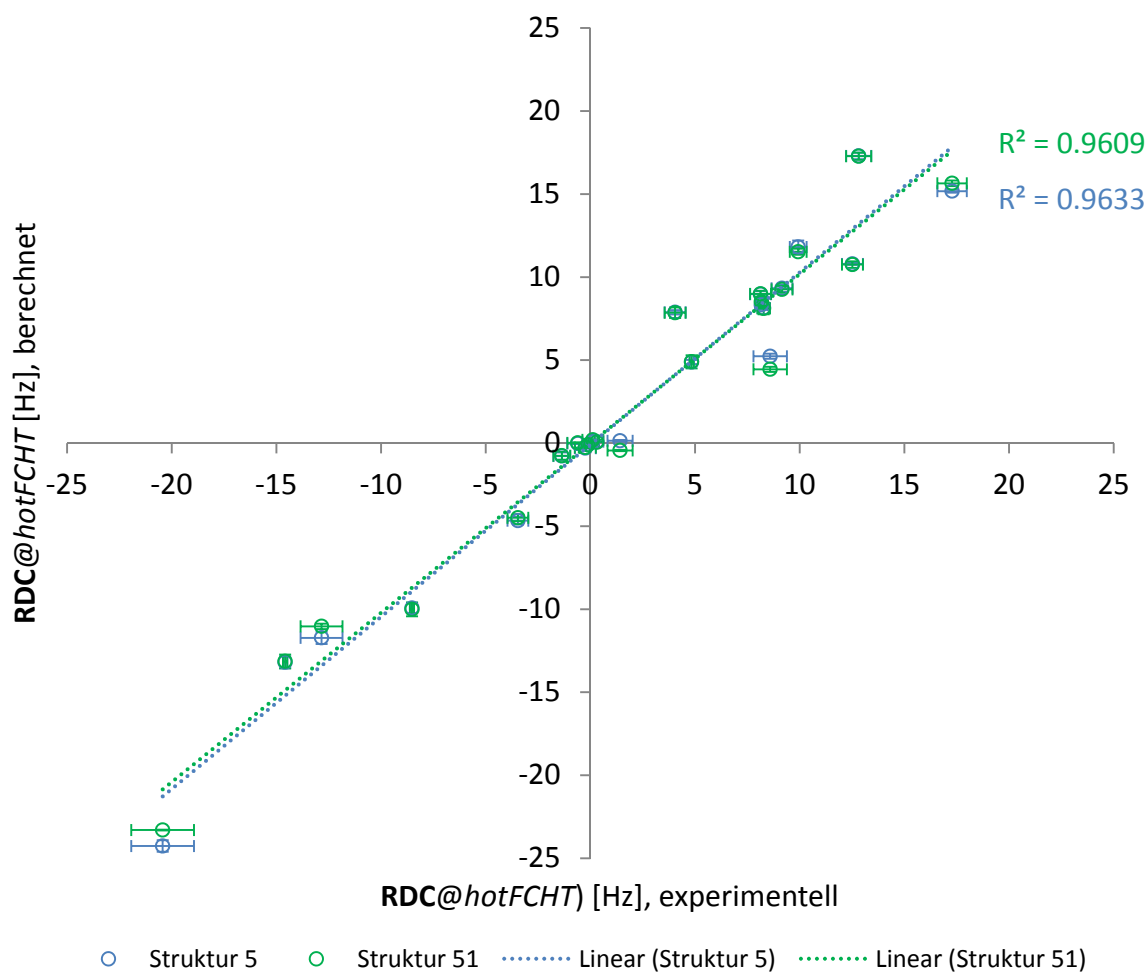


Abbildung 46: Korrelationen zwischen experimentellen und berechneten RDCs mit der Software RDC@hotFCHT. Dazu wurden die Strukturen 5 und 51 mit den besten RMSD-Werten unter Verwendung von 23 RDCs aus **RUN420b** genutzt. Die experimentellen Fehler sind auf der Abszisse und berechneten RDC-Werte auf der Ordinate mit den entsprechenden Fehlerbalken aufgetragen.

Um die strukturellen Merkmale besser herausarbeiten zu können, wurden die Torsionswinkel ϕ (φ) und ψ (ψ) der 20 energieärmsten Strukturen aus dem **RUN420b** bestimmt. Diese zeigen recht homogene Werte auf, siehe auch Tabelle 7. Die Peptidbindungen ω zeigen immer annähernd planare Winkel bei allen Aminosäuren auf. Diese liegen nahe am Idealwert von 180° bei der *trans*- bzw. 0° bei der *cis*-Konformation (Val7-MePro8). Dies ist ein Unterschied zu den Strukturen, welche zum Beispiel mit ROE-restraints (Tabelle 10, NOE/MD (SYBYL)-MD-Simulation) oder auch ganz ohne restraints (Tabelle 14, conformational-search-Methode, Maestro-Schrödinger) generiert wurden.

Tabelle 7: Torsionswinkel ϕ , ψ und ω des zyklischen Peptidrückgrats (**RUN420b**). Die Winkel sind Mittelwerte über die energieärmsten 20 Strukturen. Die Standardabweichungen sind in der jeweils nachfolgenden Spalte gezeigt.

420b	Phi (ϕ)	\pm	Psi (ψ)	\pm	Omega (ω)	\pm
THR3	-58	86	-140	2	180 (-180)	0
LEU4	-101	3	149	9	179	0
MePRO5	-69	11	72	3	-180	0
LEU6	-132	13	129	27	180 (-180)	0
VAL7	-125	28	12	11	-180	0
MePRO8	-76	1	173	4	-1	0
LEU9	125	9	-78	7	180 (-180)	0
GLY10	69	8			180 (-180)	0

Stellt man die in Tabelle 7 eingetragenen Winkel ϕ und ψ in dem Ramachandran-Plot dar, so wird die größere Streuung der Winkel ψ bei Leu6 und ϕ bei Val7 anhand der Fehlerbalken direkt sichtbar, siehe auch Abbildung 47. Thr3 ist eine Ausnahme, da die Winkel ϕ und ψ außerhalb des zyklischen Teils liegen und somit aufgrund der Flexibilität der Seitenkette größere Streuungen aufweisen. Alle anderen Winkel der 20 Strukturen liegen gut beieinander. Die Koordinate 125°/ -78° liegt nicht im zweiten sondern im vierten Quadranten des Ramachandran-Plots. Diese Winkelkombination beschreibt die D-konfigurierte Aminosäure Leu9. Alle anderen Aminosäuren sind wie zuvor beschrieben L-konfiguriert.

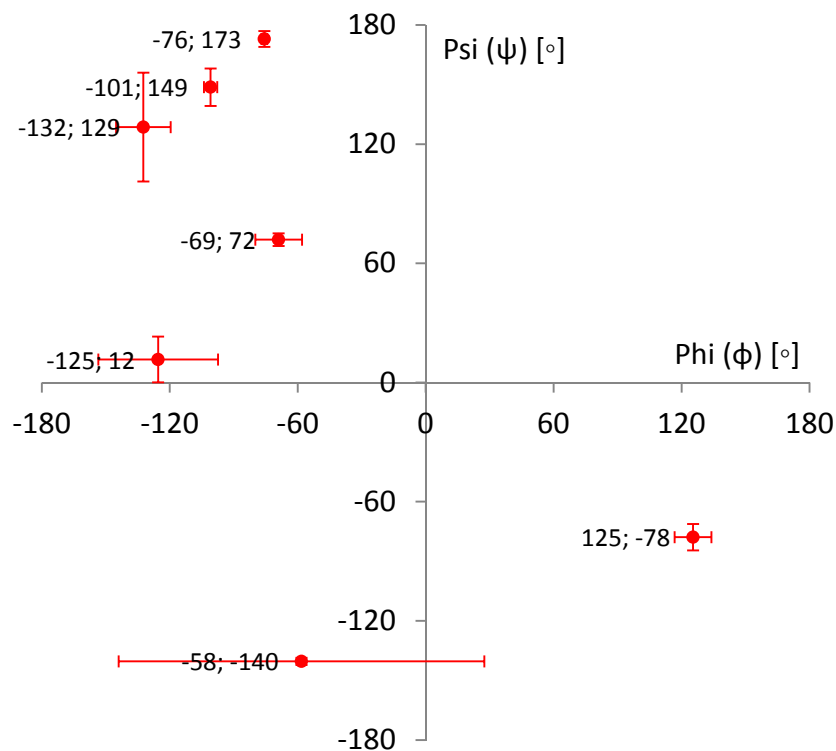


Abbildung 47: Graphische Darstellung der Torsionswinkel ϕ und ψ im zyklischen Peptidrückgrat mit Fehlerindikatoren der besten 20 Strukturen. Die Koordinate $-69^\circ/72^\circ$ zeigt die Winkelkombination der inversen- γ -Schleife von Leu4 an.

Enge Schleifen in Peptid- und Proteinstrukturen als sekundäre Strukturmerkmale werden, wie schon in Kapitel 3.3.1 kurz angesprochen, durch charakteristische Winkel im Peptidrückgrat beschrieben.¹⁶⁵ Eine typische Schleife ist die γ - bzw. inverse- γ -Schleife. Die inverse- γ -Schleife wird durch die Winkelkombinationen -95° bis -70° für ϕ bzw. 45° bis 75° für ψ für eine *L*-Aminosäure beschrieben.²⁰⁵ Dieser Winkelbereich wird auch bei allen 20 Strukturen aus **420b** bei der Aminosäurekette Leu4-Pro5-Leu6 vorgefunden. Konkret liegen die Werte hier im Bereich von $\phi = -69^\circ (\pm 11^\circ)$ und $\psi = 72^\circ (\pm 3^\circ)$. Am Beispiel der Struktur 5 wird die inverse- γ -Schleife exemplarisch für alle anderen Strukturen in Abbildung 48 gezeigt. Die Schleife wird durch die Wasserstoffbrückenbindung von Leu6-NH zur Leu4-Carbonyl-Gruppe fixiert. Ansonsten sind keine typischen sekundären Strukturelemente anhand der Torsionswinkel im zyklischen Teil identifizierbar.

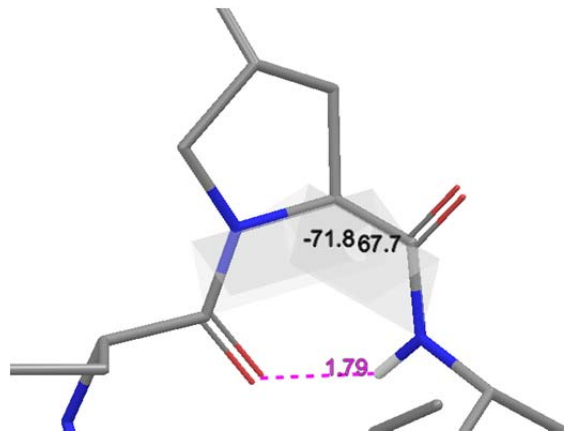


Abbildung 48: Darstellung der inversen γ -Schleife (γ_i) von Leu4 (i) am Beispiel von Struktur 84. Die ϕ - und ψ -Winkel von Pro5 (i+1) liegen im charakteristischen Bereich (bei einer *L*-Aminosäure).

Der Vollständigkeit halber sei hier am Ende des Kapitels noch auf die ermittelten Tensorkomponenten A_a , A_r und GDO verwiesen, die sich im Vergleich zu denen aus Tabelle 5 und Tabelle 6 nicht wesentlich geändert haben, siehe dazu Tabelle 20.

4.1.3. Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die in der Arbeit von LANNES und KURZ generierten Strukturen, die auf der Basis einer ROE/MD-Simulation ermittelt wurden, wurden nicht gut von den hier ermittelten RDCs aus Tabelle 4 beschrieben. Auch in einer nachfolgenden restraint-freien Konformationssuche konnten keine Strukturen gefunden werden, die im Einklang mit den experimentellen RDC-Werten waren. Die Methode wie sie bei kleinen Molekülen häufig verwendet wird, d.h. erst Strukturgenerierung und anschließende Anpassung an die RDC-Daten funktionierte hier bei der Peptidstruktur nicht. Daher wurden im Weiteren die Strukturberechnungen mit dem Softwarepaket XPLOR-NIH mit der tensor-Implementierung durchgeführt. Mit diesem Programm konnten neben den ROE- auch direkt gebundene RDC-restraints während der Simulation berücksichtigt werden.

Die Strukturen welche mit allen bestimmten 146 ROEs erzeugt wurden, wiesen einige größere ROE-Verletzungen auf was generell zu hohen Molekülenergien E_{overall} führte. Viele der ROE-Verletzungen sind vor allem bei Methyl- und N-Methylgruppen an den frei rotierbaren Bindungen der Aminosäureseitenketten aufgetreten, aber auch einige Abstandsdistanzen von mehr als 5 Å waren betroffen. Daher wurden die betreffenden ROE-Daten in der nachfolgenden Berechnung nicht mehr verwendet. Mit dem reduzierten ROE-Datensatz und den 16 Rückgrat-RDC-Werten konnten 96 Strukturen mit deutlich geringeren Abstandsverletzungen und Molekülenergien generiert werden. Die 20 energetisch besten Strukturen, die XPLOR-RMSD-Werte um ca. 0.6 Hz aufwiesen, wurden anschließend mit der Software *RDC@hotFCHT* rückgerechnet um die Datenkonsistenz zu überprüfen. Alle betrachteten Strukturen konnten bestätigt werden. Die mit *RDC@hotFCHT* ermittelten RMSD-Werte der 20 Strukturen lagen nahe beieinander und hatten Werte um $1.4 \text{ Hz} \pm 0.2 \text{ Hz}$, siehe auch Tabelle 20 in Kapitel 6.1. Die Überlagerung der Strukturen anhand der Schweratome des zyklischen Rückgrats ergab bei den 20 Strukturen einen Bereich von $< 0.2 \text{ Å}$.

Durch Verwendung von 4 weiteren RDC-Werten bei der *RDC@hotFCHT* Analyse aus dem Prolin 5 Ring konnten 3 der 20 Strukturen identifiziert werden, welche gute RMSD-Werte ergaben (5 (1.7 Hz), 84 (1.6 Hz), 51 (1.5 Hz)). Bei diesen Strukturen befindet sich der Prolin-Ring in der *down*-Konformation. Bei den Strukturen in denen sich der Prolin-Ring 5 in der *up*-Position befindet ist der RMSD-Wert (4 (4.9 Hz), 78 (5.1 Hz), 14 (5.1 Hz), 13 (4.9 Hz)) besonders schlecht, siehe auch Abbildung 45. Überlagert man die 3 Strukturen (5, 84, 51) anhand der Schweratome des zyklischen Rückgrats, so ergibt sich quasi die gleiche Struktur ($\text{RMSD} < 0.1 \text{ Å}$), lediglich der Prolin 8 Ring zeigt bei der Struktur 84 in die *up*-Konformation, siehe Abbildung 49 D. Die Überprüfung der drei Strukturen mit den zusätzlichen RDC-Werten des Prolin 8 Ringes ergab, dass die beiden Strukturen 5 und 51 einen deutlich besseren RMSD-Wert ergeben (je 1.9 Hz) als die Struktur, in der der Prolin 8 Ring in der *up*-Konformation ist (2.4 Hz), siehe auch Abbildung 49 E. Da es jedoch Abweichungen zwischen den experimentellen und berechneten RDC-Werten der Prolin 8 Kopplungen gibt ($\text{C}\delta\text{H}\delta 2$, 8.59 Hz/ 4.46 Hz bzw. 5.23 Hz und $\text{C}\gamma\text{H}\gamma 1$, 12.82 Hz/ 17.29 Hz bzw. 17.28 Hz) ist diese Ringkonformation seitens der RDCs nicht mit 100% abgesichert, sondern es könnte zum Beispiel auch eine twist-Konformation des Rings vorliegen. Prinzipiell lässt sich der zyklische Peptidring von MGM gut mit einer starren Struktur darstellen. Die Überlagerung der Struktur 5 bzw. 51 mit den Strukturen aus **420a** (Abbildung 49 B) zeigt die Vorteile der RDC-restraints auf. Neben der Rückgratverfeinerung sind sie vor allem auch bei der Feinjustierung (zum Beispiel bei den Prolinringen) ein hilfreicher Parameter. Zwar liegen die *down*-Konformationen auch bei den Sybyl-Konformationen in Abbildung 30 vor, jedoch war deren explizite Bestimmung über die Kopplungskonstanten nicht eindeutig.²⁰² Schaut man sich die Überlagerung der Sybyl-Konformationen mit der Struktur 5 an, so erkennt man im Vergleich kleinere Abweichungen im Rückgrat im Bereich von Leu 9 bis Thr 3. Ansonsten stimmt das Rückgrat in den beiden Strukturen gut überein, siehe auch Abbildung 49 C. Die Überlagerung des Peptidrückgrats mit Struktur 5 ergibt einen RMSD von etwa 0.5 Å. Alle die in 4.1.2 definierten

strukturellen Merkmale bleiben auch in den RDC-Strukturen erhalten. Die inverse- γ -Schleife konnte als sekundäres Strukturelement bestimmt werden.

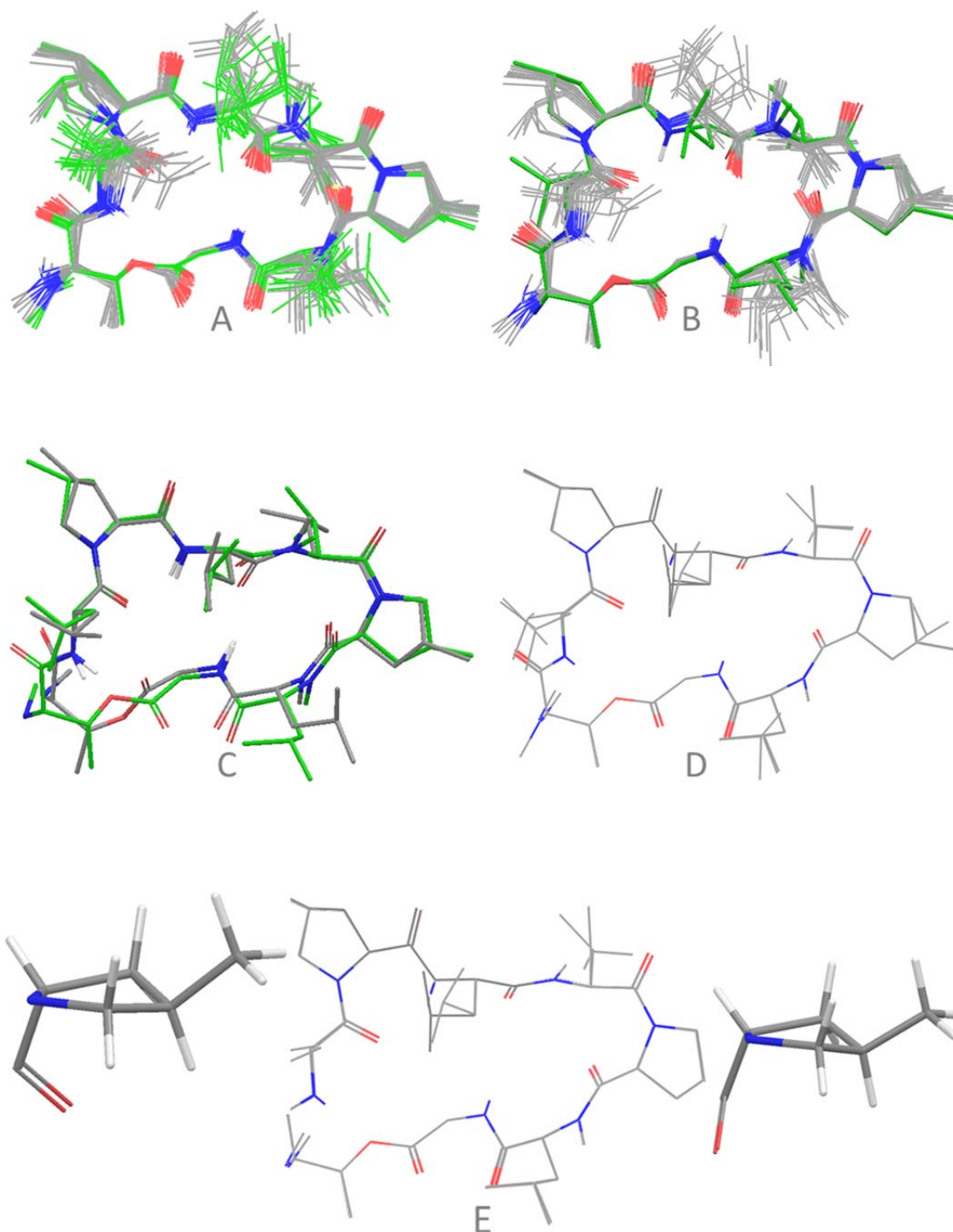
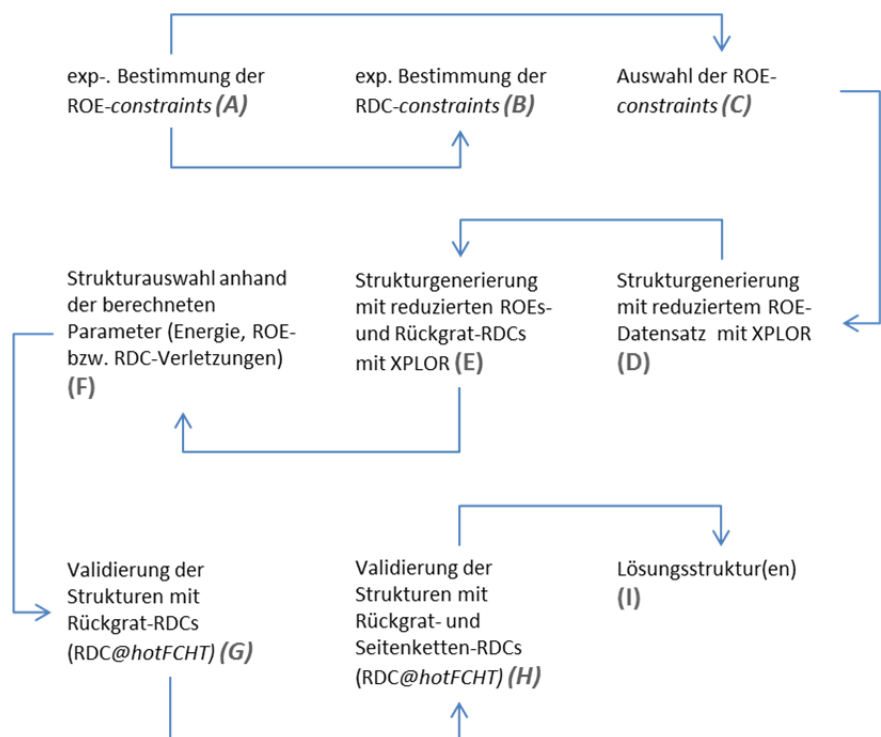


Abbildung 49: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus der MGM-Analyse. Die peptidische Seitenkette wurde der Übersichtlichkeit wegen weggelassen. **A**: Überlagerung der jeweils 20 energieärmsten Strukturen aus **420a** (40 ROEs, grau) und **420b** (40 ROEs und 16 RDCs, grün) **B**: Überlagerung der 20 energieärmsten Strukturen aus **420a** (40 ROEs, grau) mit der Struktur 5 (40 ROEs und 23 RDCs, grün) **C**: Überlagerung der Struktur 5 (40 ROEs und 23 RDCs, grün) mit der KURZ/LANNES-Struktur (146 ROEs, grau, Abbildung 30) **D**: Überlagerung der drei besten Strukturen bzgl. des RMSD-Wertes ((5 (1.7 Hz), 51 (1.5 Hz), 84 (1.6 Hz)) (40 ROEs und 20 RDCs) **E**: Überlagerung der zwei besten Strukturen bzgl. des RMSD-Wertes ((5 (1.9 Hz), 51 (1.9 Hz)) (40 ROEs und 23 RDCs) mit den beiden Prolin-Ringkonnektionen in der *down*-Position.

Zusammenfassend ist noch einmal der Weg der durchgeführten MGM-Analyse mit ROE- und RDC-restraints von der Strukturgenerierung bis zur Strukturidentifizierung graphisch dargestellt. Mit diesem Ansatz konnten in der Arbeit zwei Strukturen identifiziert werden, welche sowohl die reduzierten ROE- als auch RDC-restraints erfüllen.



RDC@hotFCHT

RMSD 89 1.38 Hz	RMSD 79 1.47 Hz	RMSD 14 1.34 Hz	RMSD 15 1.43 Hz	RMSD 38 1.51 Hz
RMSD 13 1.24 Hz	RMSD 4 1.32 Hz	RMSD 24 1.51 Hz	RMSD 56 1.38 Hz	
RMSD 31 1.46 Hz	RMSD 27 1.39 Hz	RMSD 78 1.24 Hz	RMSD 41 1.45 Hz	
RMSD 71 1.39 Hz	RMSD 67 1.44 Hz	RMSD 44 1.48 Hz	RMSD 85 1.37 Hz	
RMSD 5 1.38 Hz	RMSD 84 1.39 Hz	RMSD 51 1.37 Hz		
RMSD 51 1.51 Hz	RMSD 84 1.63 Hz			
RMSD 5 1.71 Hz				
RMSD 51 1.9 Hz				
RMSD 5 1.9 Hz				

Abbildung 50: Obere Abbildung: Schematische Darstellung der durchgeführten MGM-Analyse. Untere Abbildung zeigt die Strukturvalidierung anhand des RMSD-Wertes mit RDC@hotFCHT. In schwarz sind die Strukturen welche mit 16 RDCs, in blau mit 20 RDCs (Pro5) und in grün mit 23 RDCs (Pro5 und 8) ermittelt wurden.

4.2. Diacetylhygrophorone A¹²

Der Inhalt dieses Kapitels ist bereits veröffentlicht:

V. Schmidts, M. Fredersdorf, T. Lübken, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, C. M. Thiele, RDC-Based Determination of the Relative Configuration of the Fungicidal Cyclopentenone 4,6-Diacetylhygrophorone A¹², *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 839–844, DOI: [dx.doi.org/10.1021/np300728b](https://doi.org/10.1021/np300728b)

Wissenschaftler des Leibnizinstitutes für Pflanzenbiochemie entdeckten 2004 in Pilzen eine Substanz, die als Leitstruktur für neue Antibiotika dienen könnte.²⁹ Dort sind Pilze der Gattung *Hygrophorus* (Schnecklinge) aufgefallen, deren Fruchtkörper kaum von parasitischen Pilzen befallen werden. Aus den Fruchtkörpern der Pilzarten *Hygrophorus latitabundus*, *H. olivaceoalbus*, *H. personii* und *H. pustulatus* konnten daraufhin am Institut zwanzig neue Cyclopentenon-Derivate, die Hygrophorone, isoliert und in Aktivitätsstudien deren antifungische und antibakterielle Wirksamkeit nachgewiesen werden. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie und der Massenspektrometrie (MS) wurden die verschiedenen Konstitutionen der Hygrophorone bestimmt.

Prinzipiell sind diese aus einer 2-Cyclopentenon Einheit mit Hydroxy- oder Acetoxy-Substituenten an C4 und C5 und einer ungeradzahlig Alkylkette, ebenfalls an C5, welche an C6 hydroxyliert, acetyliert oder oxidiert sind, aufgebaut, siehe auch Abbildung 51.

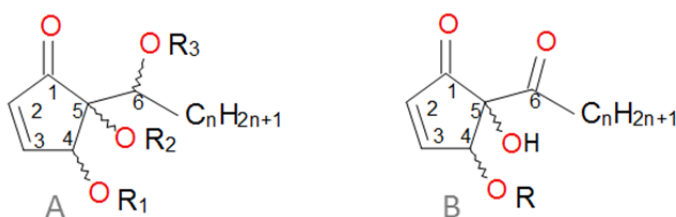


Abbildung 51: Konstitutionen der Hygrophoron-Derivate. A: mit Hydroxy- oder Acetoxy-Gruppe an C6 und B: mit zum Keton oxidierten C6.

Die relativen Konfigurationen der Substituenten im Ring an C4 und C5 konnten unter Zuhilfenahme der ³J-Kopplungskonstanten zwischen H3 und H4 und der ⁴J-Kopplungskonstanten zwischen H2 und H4 und deren Vergleich mit Literaturdaten von 4,5-*trans*-Epipentenomycin²⁰⁶ bzw. 4,5-*cis*-Pentenomycin²⁰⁷ bestimmt werden. Der Vergleich ergab, dass die Hygrophorone, welche aus *H. personii* und *H. latitabundus* isoliert wurden, *trans*-, die aus *H. olivaceoalbus* und *H. pustulatus* *cis*-konfiguriert sind. Diese Ergebnisse wurden durch NOE-Messungen unterstützt. Während ein NOE vom OH an C5 zum Proton an C4 bei *trans*-konfigurierten Derivaten sichtbar ist, kann bei *cis*-konfigurierten Derivaten kein NOE beobachtet werden. Die Konfiguration an C6 ist bei *H. personiee* und *H. olivaceoalbus* bis dato unbekannt, da dieses Zentrum mit herkömmlichen NMR-Methoden

kaum zugänglich ist.²⁰⁸ Wie aus der Abbildung 51 ersichtlich ist, fehlt dieses Stereozentrum bei *H. pustulatus* und *H. latitabundus*, da hier die Acetoxy- Gruppen durch eine Carbonylgruppe ersetzt ist. Mit Hilfe der dipolaren Restkopplungen soll nun an einem Hygrophoron A Derivat gezeigt werden, dass die Relativkonfiguration der Stereozentren C4, C5 und C6 auch direkt bestimmbar ist, ohne sich auf Literaturvergleiche stützen zu müssen. Hierzu wurde das aus *H. Persoonii* isolierte, in Abbildung 52 gezeigte Diacetylhygrophorone A¹² ausgewählt.

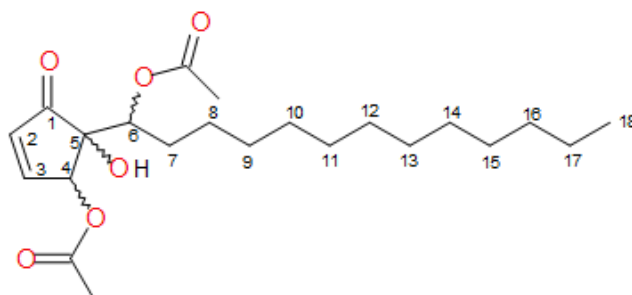


Abbildung 52: Diacetylhygrophorone A¹² zur Bestimmung der relativen Konfiguration der Stereozentren C4, C5 und C6 mit Hilfe dipolarer Restkopplungen durch partielle Orientierung des Moleküls in einem geeigneten Medium.

Zuerst wurde daher eine Konstitutionsbestätigung der Verbindung mit klassischen NMR-Experimenten durchgeführt. Anschließend wurden die zur Konfigurationsermittlung notwendigen Gleichgewichtsstrukturen von energetisch bevorzugten Konformeren mit Hilfe von Kraftfeld- und quantenmechanischen Methoden ermittelt werden. Dabei wurde sowohl die etwaige Flexibilität des 2-Cyclohexenonrings als auch die Rotation der Substituenten an C4, C5 und C6 berücksichtigt. Schließlich wurde die Bestimmung der relativen Konfiguration und Konformation des Hygrophoron Derivates mit Hilfe der RDC-Analyse durchgeführt. Besonders herausfordernd bei diesem Projekt war zum einen die geringe Substanzmenge, eine Geräteausstattung wie hier in Kapitel 3.3.2 beschrieben stand hier nicht zur Verfügung, aber auch die molekülbedingte geringe Anzahl an $^1J_{CH}$ - bzw. $^1T_{CH}$ -Kopplungen. Da mindestens sechs RDCs ermittelt werden müssen, damit zwischen verschiedenen Strukturvorschlägen unterschieden werden kann¹⁴, war es hier notwendig, neben den etablierten CLIP/CLAP-HSQC¹²⁷- auch Experimente für heteronukleare Weitbereichskopplungen ($^nJ_{C-H}$) durchzuführen, siehe auch Tabelle 2. Bei den meisten durchgeführten Experimenten wie XLOC^{138,139,147}, E.COSY¹⁴⁰ und Breitband- J-HMBC^{138,149} konnten aus den anisotropen Spektren keine Kopplungen extrahiert werden, da keine oder nur sehr wenig Signalintensität, selbst bei langen Messzeiten > 24 h, erkennbar war. Lediglich aus den HETLOC^{132,133}-Spektren konnten vier zusätzliche Kopplungen ermittelt werden. Zusammen mit den vier Kopplungen aus den CLIP-HSQC Spektren standen nun insgesamt 8 Kopplungen für die Analyse zur Verfügung. An dieser Stelle sei noch kurz erwähnt, dass als Alignment-Medium PBLG aus dem Arbeitskreis THIELE verwendet wurde (99,75 mg Mesogen 997 mg CD₂Cl₂) welches eine Quadrupolaufspaltung von 148 Hz aufzeigte.

Atom 1	Atom 2	T-Kopplung [Hz]	J- Kopplung [Hz]	Ablesefehler [Hz]	RDC [Hz]
C2	H2	187.57	175.87	0.5	5.85
C3	H3	143.12	173.16	0.2	-15.02
C4	H4	164.59	154.74	0.5	4.925
C6	H6	238.02	149.25	1.0	44.385
C4	H3	3.58	2.55	0.5	0.515
C4	H2	10.81	10.63	0.5	0.09
C3	H2	1.37	3.12	0.3	-0.875
C3	H4	2.35	-5.89	0.2	4.12

Nachfolgend wird noch kurz am Beispiel der $^2\text{J}_{\text{C}_4\text{H}_3}$ - bzw. $^2\text{T}_{\text{C}_4\text{H}_3}$ -Kopplung gezeigt, wie die Kopplungen inklusive des Vorzeichens aus den isotropen (schwarz) bzw. anisotropen (rot) HETLOC-Spektren bestimmt wurden. Das Vorzeichen ergibt sich aus der Richtung der ^1J - bzw. ^1T -Signalverschiebungen (von links unten nach rechts oben *plus*, von rechts unten nach links oben *minus*)

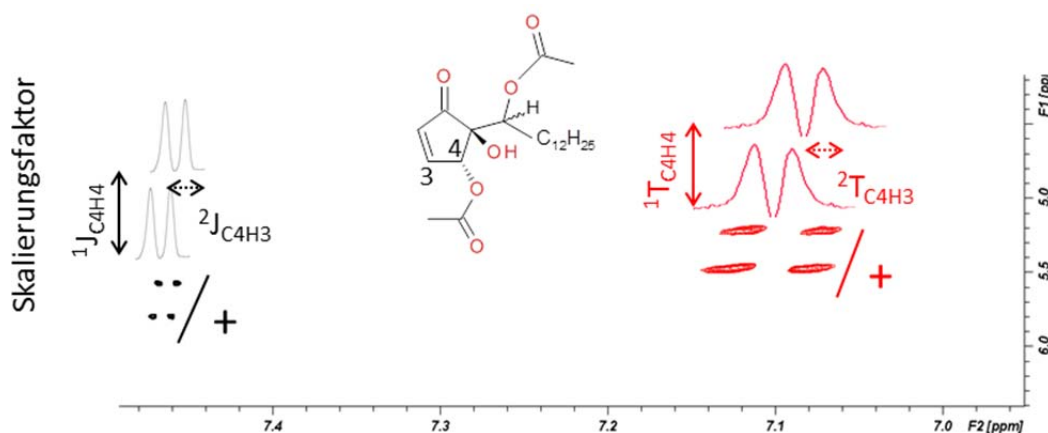


Abbildung 53: Bestimmung der Kopplungskonstante aus einem HETLOC-Experiment am Beispiel der ^2J - (schwarz) bzw. ^2T -Kopplung (rot) von C4 nach H3 von Diacetylhydroporone A¹². Die gesuchte $^2\text{J}_{\text{CHH3}}$ Kopplungskonstante wurde wie angezeigt durch die doppelte Extraktion der 1D- Spur mit Peakmaximum aus dem 2D- Spektrum entnommen und gegeneinander verschoben bis sie deckungsgleich waren. Um eine bessere digitale Auflösung von J/ T zu erhalten, wurden die ausgewählten 1D-Spuren invers Fourier transformiert, ein Zero-Filling durchgeführt und wieder Fourier transformiert. Die Vorzeichen der Kopplungskonstanten wurden aus den Steigungen der Verschiebevektoren bestimmt, in dem gezeigten Beispiel waren beide Kopplungen T und J positiv.

Mit den in Tabelle 8 bestimmten RDC-Werten konnte in Kombination mit den Strukturvorschlägen aus Kraftfeld- (FREDERSDORF) und DFT-Rechnungen (SCHMIDTS) ein Diastereomer gefunden werden, welches eine sehr gute Korrelation zwischen experimentellen und berechneten RDCs aufzeigte. Es handelt sich dabei um die Konfiguration *4R,5S,6R* bzw. *4S,5R,6S*. Die zunächst vermutete freie Drehbarkeit der Seitenkette konnte nicht beobachtet werden. Die detaillierten

Ergebnisse der am Diacetylhygrophorone A¹² durchgeführten Analysen und die entsprechenden Schlussfolgerungen sind in der nachfolgenden Veröffentlichung beschrieben. Der Verweis auf die dazugehörige „Supporting-Information“ ist in Kapitel 6.2 angefügt.

RDC-Based Determination of the Relative Configuration of the Fungicidal Cyclopentenone 4,6-Diacetylhygrophorone A¹²

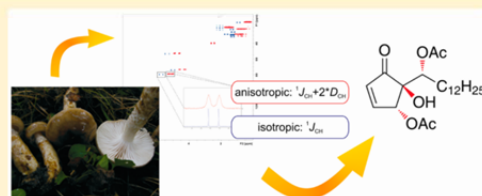
Volker Schmidts,[†] Maic Fredersdorf,[†] Tilo Lübken,[‡] Andrea Porzel,[‡] Norbert Arnold,[‡] Ludger Wessjohann,^{*,‡} and Christina M. Thiele^{*,†}

[†]Clemens Schöpf Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 22, D-64287 Darmstadt, Germany

[‡]Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, D-06120 Halle/Saale, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: The hygrophorones, a class of cyclopentenones isolated from fruiting bodies of the genus *Hygrophorus* (basidiomycetes), show promising antifungal activity. While the constitution of 4,6-diacetylhygrophorone A¹² (3) and the relative configuration of the stereogenic centers in the cyclopentenone ring were elucidated using standard NMR and MS techniques, the relative configuration of the exocyclic stereogenic center could not be assigned. By introducing a sample of 3 into an alignment medium and measuring anisotropic NMR parameters, namely, residual dipolar couplings, we were able to unambiguously determine the relative configuration of all three stereogenic centers in 4,6-diacetylhygrophorone A¹² simultaneously by fitting several structure proposals to the experimental data.



■ INTRODUCTION

The fruiting bodies of basidiomycetes fungi represent a rich source of new natural products, some of them with bioactive properties. In 2004 it was recognized in field observations that fruiting bodies of the genus *Hygrophorus* are rarely attacked by parasitic fungi,^{1,2} and it was assumed that these mushrooms contain some biologically active compounds. Such compounds from natural sources could be very interesting in the pharmaceutical discovery process because they can be used as new lead structures in drug development.

In the studies mentioned above, a series of 20 new 5-(hydroxyalkyl)-2-cyclopentenone derivatives, grouped into families called hygrophorones A–G, were separated and isolated from different *Hygrophorus* species. The structures were elucidated by classical NMR and MS methods, and the results are shown in Figure 1.

Chemically, hygrophorones are 2-cyclopentenones with hydroxy or acetoxy substituents at C4 and/or C5, and an odd-numbered 1'-oxidized alkyl chain is attached to C5 (the numbering scheme is shown in Figure 2). For the assignment of the relative configuration of the stereogenic centers within the ring, previous studies looked at long-range ³J_{H3–H4} and ⁴J_{H2–H4} coupling constants and compared them to the corresponding coupling constants of the known antibiotic compounds pentenomycin I³ and epipentenomycin I.^{4,5} Epipentenomycin I (1) shows a rather small ³J_{H3–H4} coupling constant of 2.1 Hz in comparison to pentenomycin I (2), with 2.7 Hz. For the ⁴J_{H2–H4} coupling constant the situation is vice versa, a small coupling constant of 1.2 Hz in 2 and a bigger one of 1.6 Hz in 1. Due to the similarity of the coupling constants of 4,6-diacetylhygrophorone A¹² (3) (³J_{H3–H4} = 2.1 Hz and

⁴J_{H2–H4} = 1.8 Hz) and epipentenomycin (1), it is believed that hygrophorones A may be 4,5-*trans* configured, while hygrophorones B are supposed to be 4,5-*cis* configured.

This result was supported by nuclear Overhauser effect (NOE) contacts from the hydroxy group at C5 to the proton at C4 in the 4,5-*trans*-configured hygrophorones A, whereas no NOE contact could be observed in 4,5-*cis*-configured hygrophorones B.

However, due to the quaternary carbon C5, there is no scalar coupling pathway relating the exocyclic stereogenic center on C6 to the stereogenic centers in the cyclopentenone ring. Also no characteristic NOE contacts could be observed for H6. The relative configuration of C6 is therefore still unknown and difficult to establish using classical NMR parameters.

In this work we employed residual dipolar couplings (RDCs) as an anisotropic NMR parameter to determine the relative configuration of all three stereogenic centers of 4,6-diacetylhygrophorone A¹² (3) simultaneously. A comparison with literature data as described above is not necessary, because, in contrast to the traditional NMR methods, dipolar couplings provide nonparametrized structural information of a nonlocal character. This is achieved by fitting the experimental RDCs to a global property, the alignment tensor. With the alignment tensor, distances and angles can be back-calculated and compared to structural proposals, thereby enabling the determination of the relative spatial arrangement of nuclei in a molecule, which are in turn interpreted in terms of the constitution, configuration, and preferred conformation (or

Received: October 19, 2012

Published: May 9, 2013



ACS Publications

© 2013 American Chemical Society and
American Society of Pharmacognosy

839

dx.doi.org/10.1021/np300728b | J. Nat. Prod. 2013, 76, 839–844

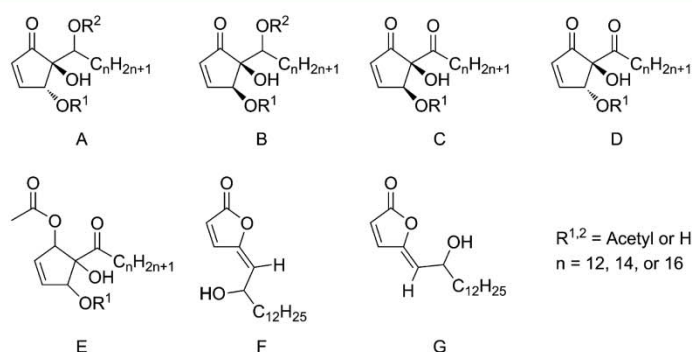


Figure 1. Hygrophorones A–G isolated from *Hygrophorus* species: *H. persoonii* (A, F, G), *H. olivaceoalbus* (B), *H. pustulatus* (C), and *H. latitabundus* (D, E).^{1,2} Constitutions were elucidated with classical NMR and MS methods. Assignment of relative configuration was based on analysis of scalar coupling constants in the cyclopentenone ring and comparison to the corresponding coupling constants of known compounds from the literature.

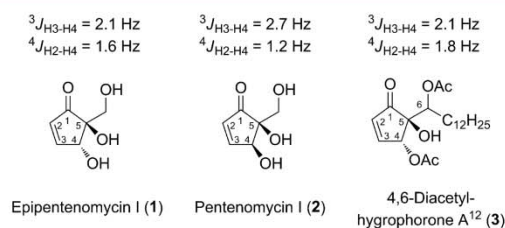


Figure 2. Comparison of the $^3J_{\text{H3-H4}}$ and $^4J_{\text{H2-H4}}$ coupling constants of known epipentenomycin (1),^{4,5} pentenomycin (2),³ and the unknown 4,6-diacetylhygrophorone A¹² (3) studied in this work. The $^3J_{\text{H3-H4}}$ and $^4J_{\text{H2-H4}}$ coupling constants of 1 are in the same range as the assumed *trans*-configured hygrophorone 3, whereas the coupling constants of pentenomycin (2) differ significantly.¹

ensemble of conformations) of the molecule.^{6–8} There are many examples in recent literature using RDCs in the structure determination of small organic molecules.^{9–27}

We therefore oriented a sample of 4,6-diacetylhygrophorone A¹² (3) in a suitable alignment medium and used RDCs to simultaneously determine the relative configuration of all stereogenic centers and also gain insight into the conformational preferences of 3.

RESULTS AND DISCUSSION

The configurational and conformational space of 3 was explored by means of molecular mechanics simulations and DFT calculations (see Experimental Section). With three stereogenic centers eight stereoisomers are conceivable. However, as the determination of the absolute configuration is not yet possible from RDCs,²⁸ we only calculated structural proposals of the four possible diastereoisomers 4*R*,5*R*,6*R*, 4*R*,5*R*,6*S*, 4*R*,5*S*,6*R*, and 4*S*,5*R*,6*R*. While the absolute configuration of 3 could also be the respective enantiomeric form, this work focuses only on determining the correct relative configuration. As only a single set of signals is observed in the chiral, nonracemic alignment medium, the natural product is present in only a single enantiomeric form.

We considered conformational flexibility of the 2-cyclopentenone ring by starting the geometry optimization from several envelope-like conformations. All calculations converged to the same ring geometry, irrespective of the starting point.

We thus assume the cyclopentenone ring to be rigid and well suited for RDC analysis.

The more challenging problem of the rotation of the side chain along the C5–C6 bond can be treated by calculating low-energy geometries for the (+)- and (–)-synclinal and antiperiplanar states of the OH–C5–C6–H6 torsion and using these conformer geometries as a cross-validation in the RDC fitting.

For the calculation of the alignment tensor of a non-symmetric molecule at least five linearly independent RDCs have to be acquired. In most studies only $^1D_{\text{CH}}$ (or $^1D_{\text{NH}}$ for biomacromolecules) from coupled HSQC-type experiments are used.²⁹ However in the hygrophorone 3, only four relevant $^1D_{\text{CH}}$ couplings are available, as shown in Figure 3. We therefore extended the NMR experiments to also include long-range $^nD_{\text{CH}}$ couplings using the HETLOC experiment.^{30,31} Due to the difficulties in the reliable experimental measurement of these RDCs, there are only a very limited number of studies employing long-range RDCs in the determination of the relative configuration of small molecules.^{12,13,32} Because RDCs are proportional to the inverse of the cubed distance (r^{-3}) between coupling nuclei, long-range RDCs are usually an order of magnitude smaller than their one-bond counterparts. When using both short- and long-range RDCs in one fit—or RDCs of different nuclear spin pairs—it is suggested that RDCs are normalized to their magnetogyric ratios and distances before the numerical fitting procedure.³³

A total of four $^1D_{\text{CH}}$ and four long-range $^{2/3}D_{\text{CH}}$ including their relative signs could be extracted from isotropic spectra as well as their counterparts in a PBLG/ CD_2Cl_2 lyotropic liquid crystalline alignment medium. The RDCs vary from –15 Hz (C3–H3) to 44.4 Hz (C6–H6). Table 1 shows the magnitude and sign of each measured RDC with the appropriate experimental error. The specified maximum error is 1 Hz (C6–H6), which, compared to the respective dipolar coupling of 44.4 Hz (C6–H6), is rather small.

The large C6–H6 coupling of 44.4 Hz is especially interesting for the structural investigation, because it represents the exocyclic stereogenic center of a hitherto unknown relative configuration. A small change in the conformation of the oxidized alkyl chain on C5 with respect to the ring should have a significant impact on the theoretical C6–H6 RDC value. Flexibility should also result in the averaging of this coupling, and thus a smaller coupling should be observed. The large value

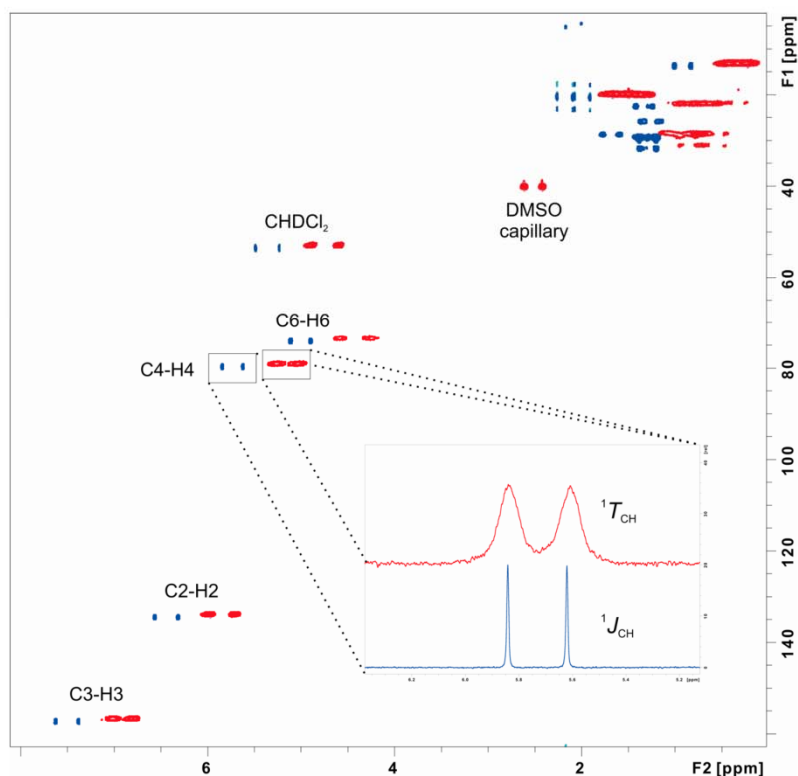


Figure 3. Superposition of ω_2 -coupled (^1H - ^{13}C)-CLIP-HSQC²⁹ spectra in isotropic (blue) and anisotropic media (red) of 4,6-diacetylhydroporphone A¹² (3). The inset shows the ω_2 -traces of the C4-H4 coupling.

Table 1. Dipolar Couplings and Their Experimental Errors of 4,6-Diacetylhydroporphone A¹² (3), As Determined from CLIP-HSQC²⁹ and HETLOC^{30,31} Experiments^a

coupling	<i>T</i> (in Hz)	<i>J</i> (in Hz)	<i>D</i> (in Hz)	
C2-H2	187.5	175.8	5.9	±0.5
C3-H3	143.1	173.1	-15.0	±0.2
C4-H4	164.5	154.7	4.9	±0.5
C6-H6	238.0	149.2	44.4	±1.0
C4-H3	3.5	2.5	0.5	±0.5
C4-H2	10.8	10.6	0.1	±0.5
C3-H2	1.3	3.1	-0.9	±0.3
C3-H4	2.3	-5.8	4.1	±0.2

^aRDCs are calculated from $T = J + 2D$.

can be seen as a first indication of limited conformational flexibility along the C5-C6 bond (see below).

Using a modified version of the hotFCHT software,³⁴ we fitted the experimental RDCs to the structure proposals from the MM/DFT calculations for the low-energy conformers of the four mentioned diastereoisomers.

Figure 4 shows the four best-fitting geometries and their respective correlation of the experimental and back-calculated RDCs. In each case a rigid geometry is assumed, and all eight RDCs are included in the fitting process. The 4*R*,5*S*,6*R* relative configuration fits the experimental data best, as evidenced by the lowest quality factor (normalized root-mean-square deviation) $Q = 0.12$. Only for the 4*R*,5*S*,6*R* configuration are

couplings reproduced reasonably well, while for the other diastereoisomers, multiple couplings show large deviations from their experimental values. As the correlation is much worse for the other diastereoisomers (by a factor of 8 to 11), we can safely assign the relative configuration of all three stereogenic centers by this method: for 4,6-diacetylhydroporphone A¹² (3) it is 4*R*,5*S*,6*R*. This corroborates the previous ^{3/4}*J*- and NOE-based findings of a *trans* arrangement of the substituents at the 4 and 5 positions. Now however, the exocyclic stereogenic center can also be correlated to the other two.

In the case of the hydroporphone 3, the one-bond RDCs are much better reproduced when using nonweighted RDCs ($Q = 0.03$ for 4*R*,5*S*,6*R*; see Supporting Information), as is expected when reducing the relative weight of the couplings with smaller magnitude in the numerical fitting. However the discrimination of relative configurations, i.e., the differences in Q values, is much more pronounced when using properly weighted RDCs.

To cross-check if rotation along the C5-C6 bond is prevalent and thus possibly impedes the rigid model, we tried fitting the seven RDCs of the cyclopentenone ring and using the resulting alignment tensor to predict the RDC for the C6-H6 coupling. Using such a back-prediction method, García et al. were able to determine the relative configuration of jaborosactol 24.¹⁸ The tensor obtained in this way differs from the tensor using all eight RDCs only in magnitude but not in its orientation, indicating that no additional flexibility is observed. In the lowest energy geometry the OH-C5-C6-H6 torsion is in an antiperiplanar arrangement and the back-

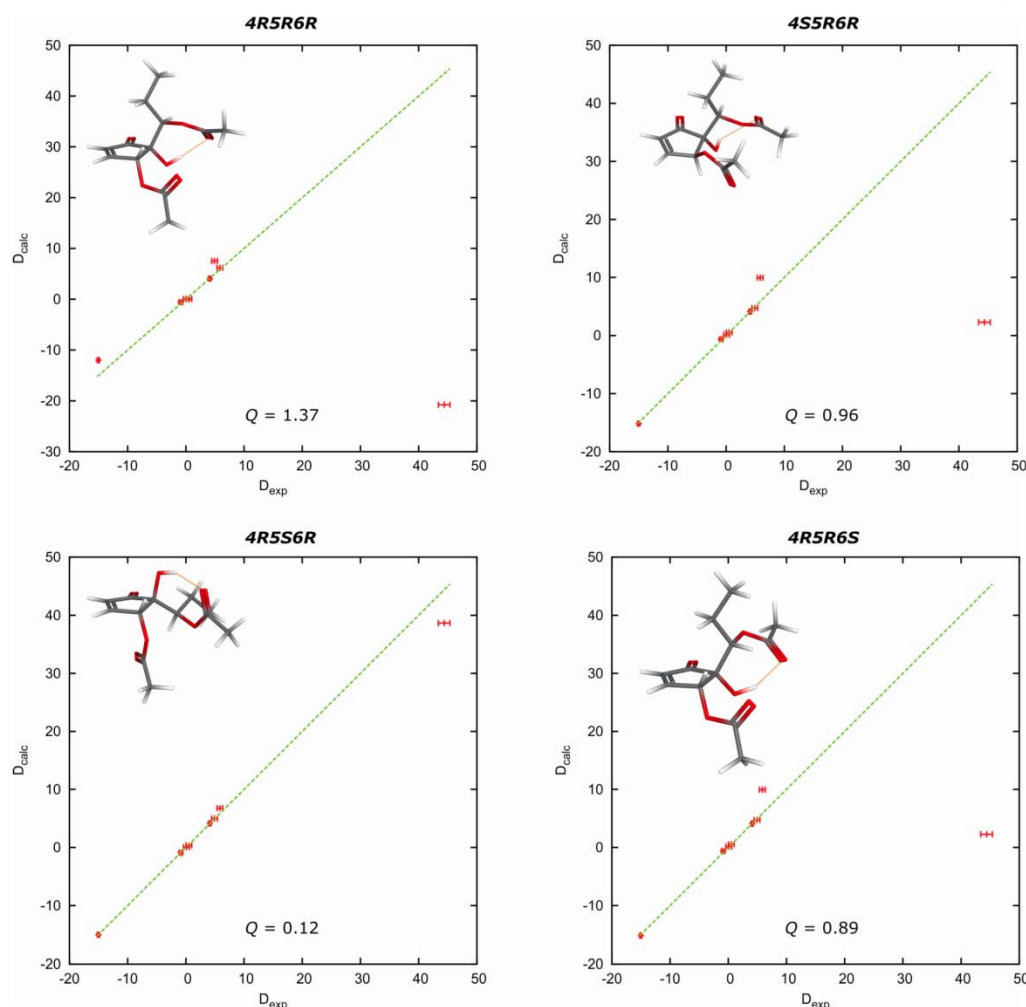


Figure 4. RDC fits of all four diastereoisomers of 4,6-diacetylhydroporone A^{12} (**3**) correlating experimental and back-calculated RDCs. The configuration 4*R*,5*S*,6*R* shows a significantly better fit with a quality factor of $Q = 0.12$ than the other relative configurations. In the structures depicted the orange dots between the hydroxy group and the carboxyl moiety at C6 indicate a proposed interaction limiting the conformational flexibility along the C5–C6 bond.

predicted C6–H6 RDC has a value of $37.7 (\pm 2.5)$ Hz, while the RDC is back-predicted to be $-0.7 (\pm 5.0)$ Hz and $-19.9 (\pm 5.0)$ Hz for the (+)- and (–)-synclinal arrangement, respectively. The antiperiplanar geometry shows an excellent agreement with the experimental value of $44.4 (\pm 1.0)$ Hz. We attribute the prevalence of the antiperiplanar geometry to an attractive interaction similar to H-bonds between the OH proton and the carbonyl group at C6. This interaction limits the conformational flexibility along the C5–C6 bond, thereby allowing the compound to be treated as a fully rigid geometry in the RDC fit.

This assessment of the conformational preferences is certainly strongly dependent on the solvent. However in this fortunate case conformational flexibility does not impede the goal of determining the relative configuration.

In conclusion, we were able to determine the relative configuration of all three stereogenic centers in the natural

product 4,6-diacetylhydroporone A^{12} (**3**) using one-bond ($^1D_{CH}$) and long-range ($^{2/3}D_{CH}$) residual dipolar couplings, where previous studies based on J couplings and NOEs could give only part of the required information. The previously proposed relative configuration of the ring carbon atom (*trans* with respect to OH and OAc) is corroborated, and the relative configuration of the exocyclic stereogenic center can now be correlated to the others. As only limited flexibility is present along the bond connecting the side chain and the cyclopentenone ring, the conformational preferences of **3** could also be studied. Using the numbering scheme of Figure 2 the relative configuration is determined as 4*R*,5*S*,6*R*.

EXPERIMENTAL SECTION

Materials. The natural product, 4,6-diacetylhydroporone A^{12} (**3**), was isolated and purified according to the literature.¹ For the liquid crystalline phase we used our in-house synthesized high molecular

weight poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG) in combination with CD_2Cl_2 as organic solvent.^{35,36}

NMR Sample Preparation. For isotropic measurements a sample of 5 mg of the hygrophorone **3** in $\sim 600 \mu\text{L}$ of CD_2Cl_2 was prepared. Anisotropic measurements were carried out on a sample where the liquid crystalline phase was prepared directly in a 5 mm NMR tube. For that purpose 101 mg of PBLG ($M_n = 1.67 \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, PDI = +1.42), 997 mg ($\sim 750 \mu\text{L}$) of CD_2Cl_2 , and 5 mg of **3** were weighed directly into the NMR tube, which contained a capillary with $\text{DMSO}-d_6$ to provide the lock signal and a target for shimming of the magnet. The sample was centrifuged to achieve homogeneity until the quadrupolar splitting of the solvent CD_2Cl_2 deduced from the ^2H NMR spectra was constant ($147 \pm 2 \text{ Hz}$).

NMR Measurements. All measurements were recorded at 300 K without sample spinning on a Bruker Avance II 700US spectrometer equipped with a CP TXI 700S4 probe.

As shown by Samulski et al.,^{37,38} the quadrupolar splitting of the deuterated solvent can be used as qualitative indicator for the alignment in the liquid crystalline (LC) phase. To ensure constant alignment conditions during NMR measurements, the stability of the LC phase was confirmed by ^2H NMR spectra before and after each anisotropic measurement. The quadrupolar splitting of the solvent signal was almost constant at 147 Hz ($\pm 2 \text{ Hz}$).

The total couplings (1T) and scalar coupling constants (1J) were recorded by clean in-phase (CLIP)-HSQC experiments²⁹ using an INEPT delay of 145 Hz. In the ω_2 dimension a total of 16 384 data points were sampled over a spectral width of 10 ppm to give an FID resolution of 0.43 Hz. In the ω_1 dimension 128 data points with a spectral width of 165 ppm were recorded, giving a spectral resolution of 227.88 Hz. The isotropic sample was measured with four scans, while the anisotropic sample required 256 scans per increment. The spectra were processed using $\pi/2$ shifted sine squared window functions with zero filling by a factor of 8 in the ω_2 dimension.

The sign and the magnitude of long-range couplings nT and nJ were recorded by using the heteronuclear long-range coupling (HETLOC) experiment.^{30,31} In the ω_2 dimension a total of 8192 data points were recorded, leading to an FID resolution of 0.85 Hz, and in the ω_1 dimension a total of 256 data points were recorded, leading to a resolution of 27.35 Hz. The isotropic sample was measured with 32 scans per increment and the anisotropic sample with 256 scans per increment. The spectra were processed using $\pi/2$ shifted sine squared window functions with zero filling by a factor of 4 in the ω_2 dimension.

Couplings were measured by extracting the relevant rows of the 2D spectra, superimposing them, and shifting one of the subspectra onto the other, such that the multiplet components show maximum overlap. By repeating this procedure manually a standard deviation is estimated and used as an experimental error for T and J . RDCs and their estimated uncertainties are then calculated from $T = J + 2D$.

Structure Generation and Molecular Order Tensor Calculation. Structure models for the RDC fitting procedure were generated using conventional force-field (SYBYL, Tripos 7.0) and DFT geometry optimization methods (Gaussian 03, B3LYP/6-311+G**).³⁹ The side chain was truncated after the second carbon atom, to accelerate the calculations. After these first few atoms the chain should have no influence on the conformational dynamics of the five-membered ring or the relative orientation of the chain with respect to the cyclic core.

The RDC calculations were performed using a self-written module of the software hotFCHT.³⁴ The program uses singular value decomposition (SVD) to determine the alignment tensor using a given structure proposal and the experimental RDCs, following a methodology established by Losonczi et al.⁴⁰ Before SVD the couplings are weighted according to their magnetogyric ratios and distances (see Supporting Information).

We used the quality factor Q , as defined by Cornilescu et al.,⁴¹ to evaluate the agreement between the observed and back-calculated RDCs, where a small Q factor indicates a good numerical fit.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

NMR spectra in isotropic and anisotropic media, Cartesian coordinates of geometry-optimized structure proposals, and RDC fits. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

* (C. M. Thiele) Tel: +49 6151 16 5112. Fax: +49 6151 16 72081. E-mail: cthiele@thielelab.de. (L. Wessjohann) Tel: +49 345 5582 1301. Fax: +49 345 5582 1309. E-mail: ludger.wessjohann@ipb-halle.de.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank the analytical sciences department of Sanofi-Aventis Deutschland, Frankfurt, Germany, for measurement time on their 700 MHz NMR spectrometer. V.S., M.F., and C.M.T. acknowledge the German Research Foundation (Emmy Noether fellowship TH1115/3-1 and Research Unit FOR934 to C.M.T.), the European Research Council (ERC starting grant to C.M.T.), and the "Studienstiftung des Deutschen Volkes" (Scholarship to V.S.) for financial support.

■ REFERENCES

- (1) Lübken, T.; Schmidt, J.; Porzel, A.; Arnold, N.; Wessjohann, L. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1061–1071.
- (2) Lübken, T.; Arnold, N.; Wessjohann, L.; Böttcher, C.; Schmidt, J. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41*, 361–371.
- (3) Umino, K.; Furumai, T.; Matsuzawa, N.; Awataguchi, Y.; Ito, Y.; Okuda, T. *J. Antibiot.* **1973**, *26*, 506–512.
- (4) Umino, K.; Takeda, N.; Ito, Y.; Okuda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 1233–1238.
- (5) Baute, M. A.; Deffieux, G.; Baute, R.; Badoc, A.; Vercauteren, J.; Leger, J. M.; Neveu, A. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1419–1423.
- (6) Böttcher, B.; Thiele, C. M. Determining the Stereochemistry of Molecules from Residual Dipolar Couplings (RDCs). In *Encyclopedia of Magnetic Resonance*; John Wiley & Sons, Ltd., 2012.
- (7) Kramer, F.; Deshmukh, M. V.; Kessler, H.; Glaser, S. J. *Conc. Magn. Reson. A* **2004**, *21A*, 10–21.
- (8) Gil, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7222–7224.
- (9) Thiele, C. M.; Berger, S. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 705–708.
- (10) Aroulanda, C.; Boucard, V.; Guibe, F.; Courtieu, J.; Merlet, D. *Chem.—Eur. J.* **2003**, *9*, 4536–4539.
- (11) Yan, J. L.; Kline, A. D.; Mo, H. P.; Shapiro, M. J.; Zartler, E. R. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1786–1795.
- (12) Verdier, L.; Sakhaei, P.; Zwickstetter, M.; Griesinger, C. *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 353–359.
- (13) Thiele, C. M.; Marx, A.; Berger, R.; Fischer, J.; Biel, M.; Giannis, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 4455–4460.
- (14) Schuetz, A.; Junker, J.; Leonov, A.; Lange, O. F.; Molinski, T. F.; Griesinger, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114–15115.
- (15) Schuetz, A.; Murakami, T.; Takada, N.; Junker, J.; Hashimoto, M.; Griesinger, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 2032–2034.
- (16) Farès, C.; Hassfeld, J.; Menche, D.; Carlomagno, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3722–3726.
- (17) Gil, R. R.; Gayathri, C.; Tsarevsky, N. V.; Matyjaszewski, K. J. *Org. Chem.* **2008**, *73*, 840–848.
- (18) García, M. E.; Pagola, S.; Navarro-Vázquez, A.; Phillips, D. D.; Gayathri, C.; Krakauer, H.; Stephens, P. W.; Nicotra, V. E.; Gil, R. R. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 5670–5674.
- (19) Kummerlöwe, G.; Luy, B. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, *68*, 193–230.

- (20) Kummerlöwe, G.; Luy, B. *TrAC Trend. Anal. Chem.* **2009**, *28*, 483–493.
- (21) Thiele, C. M.; Schmidts, V.; Böttcher, B.; Louzao, I.; Berger, R.; Maliniak, A.; Svensson, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 6708–6712.
- (22) Böttcher, B.; Schmidts, V.; Raskatov, J. A.; Thiele, C. M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 205–209.
- (23) Reinscheid, U. M.; Köck, M.; Cychon, C.; Schmidts, V.; Thiele, C. M.; Griesinger, C. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6900–6903.
- (24) Sun, H.; d'Auvergne, E. J.; Reinscheid, U. M.; Dias, L. C.; Andrade, C. K. Z.; Rocha, R. O.; Griesinger, C. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 1811–1817.
- (25) Kummerlöwe, G.; Crone, B.; Kretschmer, M.; Kirsch, S. F.; Luy, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 2643–2645.
- (26) Schmidt, M.; Sun, H.; Rogne, P.; Scriba, G. K. E.; Griesinger, C.; Kuhn, L. T.; Reinscheid, U. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 3080–3083.
- (27) Ge, H. M.; Sun, H.; Jiang, N.; Qin, Y. H.; Dou, H.; Yan, T.; Hou, Y. Y.; Griesinger, C.; Tan, R. X. *Chem.—Eur. J.* **2012**, *18*, 5213–5221.
- (28) Berger, R.; Courtieu, J.; Gil, R. R.; Griesinger, C.; Köck, M.; Lesot, P.; Luy, B.; Merlet, D.; Navarro-Vázquez, A.; Reggelin, M.; Reinscheid, U. M.; Thiele, C. M.; Zweckstetter, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 8388–8391.
- (29) Enthart, A.; Freudenberger, J. C.; Furrer, J.; Kessler, H.; Luy, B. *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 314–322.
- (30) Kurz, M.; Schmieder, P.; Kessler, H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **1991**, *30*, 1329–1331.
- (31) Uhrín, D.; Batta, G.; Hruby, V. J.; Barlow, P. N.; Kövér, K. E. *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 155–161.
- (32) Trigo-Mourino, P.; Navarro-Vázquez, A.; Ying, J. F.; Gil, R. R.; Bax, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7576–7580.
- (33) Zweckstetter, M. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 679–690.
- (34) Berger, R.; Fischer, C.; Klessinger, M. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7157–7167.
- (35) Marx, A.; Thiele, C. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 254–260.
- (36) Marx, A.; Böttcher, B.; Thiele, C. M. *Chem.—Eur. J.* **2010**, *16*, 1656–1663.
- (37) Czarniecka, K.; Samulski, E. T. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1981**, *63*, 205–214.
- (38) Poliks, M. D.; Park, Y. W.; Samulski, E. T. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1987**, *153*, 321–346.
- (39) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A., Jr.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Al-Laham, M. A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. *Gaussian 03*, Revision 6.0; Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.
- (40) Losonczi, J. A.; Andrec, M.; Fischer, M. W. F.; Prestegard, J. H. *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334–342.
- (41) Cornilescu, G.; Marquardt, J. L.; Ottiger, M.; Bax, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836–6837.

4.3. Dithienylcyclopentenones

Der Inhalt dieses Kapitels ist bereits veröffentlicht:

M. Fredersdorf, R. Göstl, A. Kolmer, V. Schmidts, P. Monecke, S. Hecht, C. M. Thiele, Exploring the Conformational Space of Bridge-Substituted Dithienylcyclopentenones, *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 14545 – 14554, DOI: 10.1002/chem.201501842

Dithienylcyclopentene (DTC) sind eine bekannte Klasse von Molekülen, welche unter Bestrahlung mit Licht der passenden Wellenlänge ihren Isomerisierungszustand reversibel ändern können und gehören daher zu der Klasse der photochromen Moleküle. Aufgrund ihrer langsamen thermischen Relaxation zur offenen Form sind sie nicht nur von akademischem Interesse sondern auch für industrielle Anwendungen (z.B. in optisch schaltbaren Transistoren) interessant.²⁰⁹ DTCs können in einer farblosen, offenen Form und einer farbigen (violetten), geschlossenen Form vorliegen.^{30,31} Die Zyklisierungsreaktion von der offenen in die geschlossene Form wird durch UV-Licht, die Ringöffnung durch Licht im sichtbaren Bereich (VIS) induziert. Wenn die parallele(n) (p) und antiparallele(n) (a-p) Konformationen gleich populiert sind, sollte die Zyklisierungsrate bei 50% liegen, da vermutet wird, dass nur die a-p-Konformation(en) zum Ringschluss führen. Durch Einführung von Seitenketten am zyklischen Pentenring versuchte man im Arbeitskreis HECHT³⁰ die freie Drehbarkeit einzuschränken um somit die a-p-Population und damit die Effizienz des Ringschlusses (>50%) zu erhöhen, siehe auch Abbildung 54. Um diesen Sachverhalt genauer zu überprüfen, führte man in Vorversuchen im Arbeitskreis HECHT NMR spektroskopische ¹H-Tiefen-temperaturmessungen durch, um die einzelnen Konformere im Protonenspektrum sichtbar zu machen. Im Idealfall bekäme man einen doppelten Signalsatz, deren Integralverhältnisse eine Aussage über die Konformerpopulation liefern würde. Dieser Ansatz lieferte jedoch selbst bei sehr tiefen Temperaturen keine eindeutigen Ergebnisse. Daher wird in dieser Arbeit über andere NMR spektroskopische Ansätze versucht, einen genaueren Einblick über die Konformere eines DTC-Derivates zu erhalten. Neben quantitativen NOE-Experimenten (KOLMER) wurde in dieser Arbeit hauptsächlich wieder die RDC-Analyse verwendet, um neben dem Konformerensemble auch das diastereoselektive Schaltverhalten eines DTC-Derivates zu bestimmen.

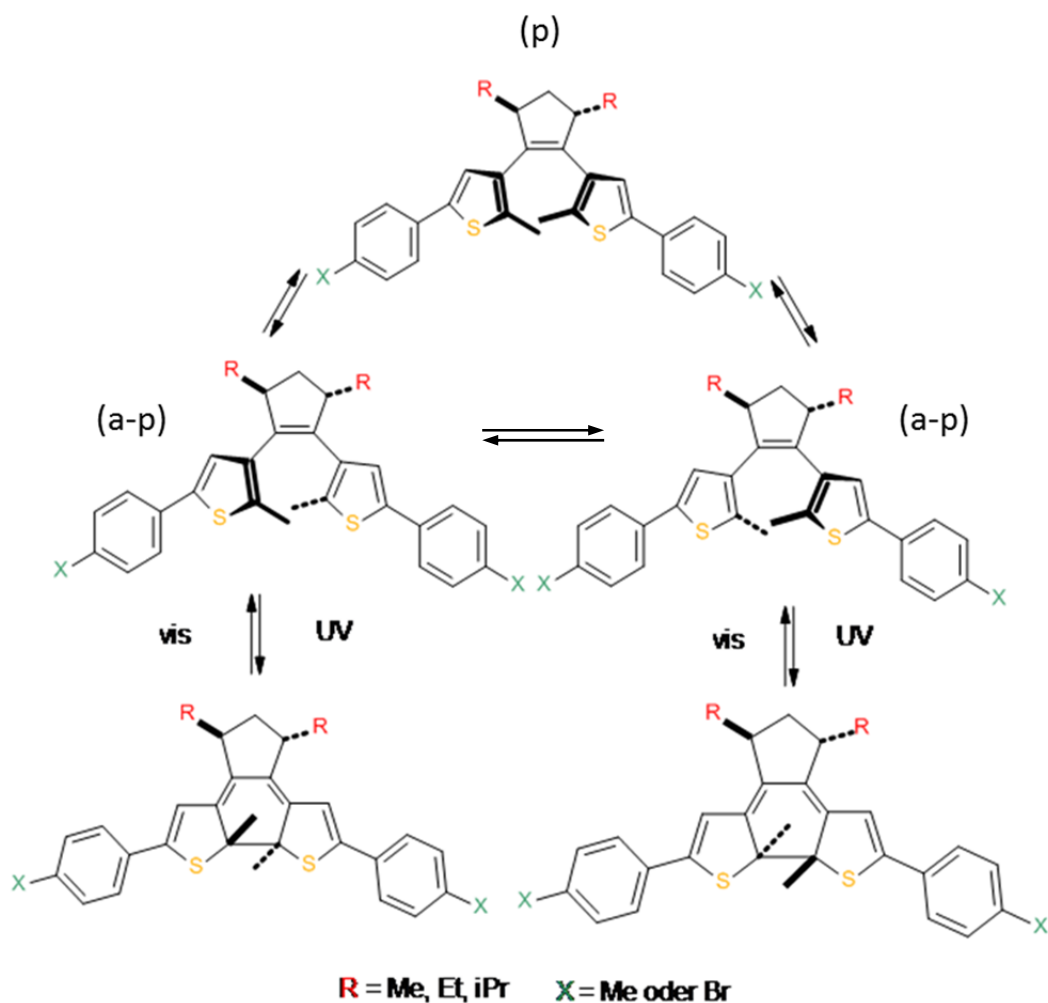


Abbildung 54: Zyklisierungsreaktion am Beispiel von Dithienylcyclopenten-Derivaten, die im Arbeitskreis HECHT synthetisiert und gereinigt wurden. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zum Ringschluss. Nach dem Bestrahlen mit sichtbarem Licht öffnet sich der Ring wieder (reversibler Prozess). Dabei entspricht (p) der parallelen und (a-p) den antiparallelen Konformation(en).

Zunächst wurde das *p*-Brom-substituierte *trans*-Diethyl-DTC-Derivat für die hier durchzuführende RDC-Analyse ausgewählt, weil es zu diesem Derivat schon eine Röntgenstruktur gab. Mit der Software SYBYL (Kraftfeld Tripos 7.0, Energieminimierung der Strukturen durch die Powell-Methode) konnten die in Abbildung 55 gezeigten Konformationen berechnet werden. Dabei entspricht die in der Abbildung linke Struktur eher der antiparallelen, die mittige der parallelen und die rechte einer Mischform. Anbei sei noch angemerkt, dass bei dieser durchgeführten MD-Suche keine restraints verwendet wurden.

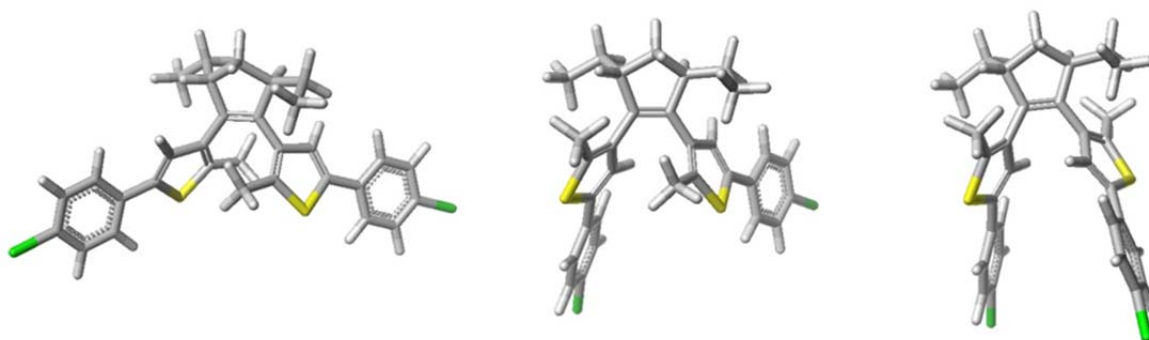


Abbildung 55: Berechnete Konformere des *p*-Brom-substituierten *trans*-Diethyl-DTC-Derivats mit der Software SYBYL.⁸⁵ Die linke Struktur entspricht der in Abbildung 54 gezeigten a-p, die mittige der p- und die rechte einer neuen, eher gemischten Anordnung.

Für die RDC-Analyse wurde die isotrope Probe (4mg Substanz) in CDCl_3 und die anisotrope Probe (6mg Substanz) in Valin-PA¹⁰⁷ (in CDCl_3) angesetzt. Aufgrund der Molekülsymmetrie ergeben die linke und die rechte Seite des Moleküls im isotropen Spektrum nur einen gemeinsamen Signalsatz, siehe Abbildung 56, blaues Spektrum. Im Protonenspektrum der anisotropen Probe sind nur sehr breite Signalpeaks, deutliche Polymerrestsignale im Bereich von 0 bis 2 ppm und eine große Hochfeldverschiebung der Signale im Vergleich zur isotropen Probe erkennbar.

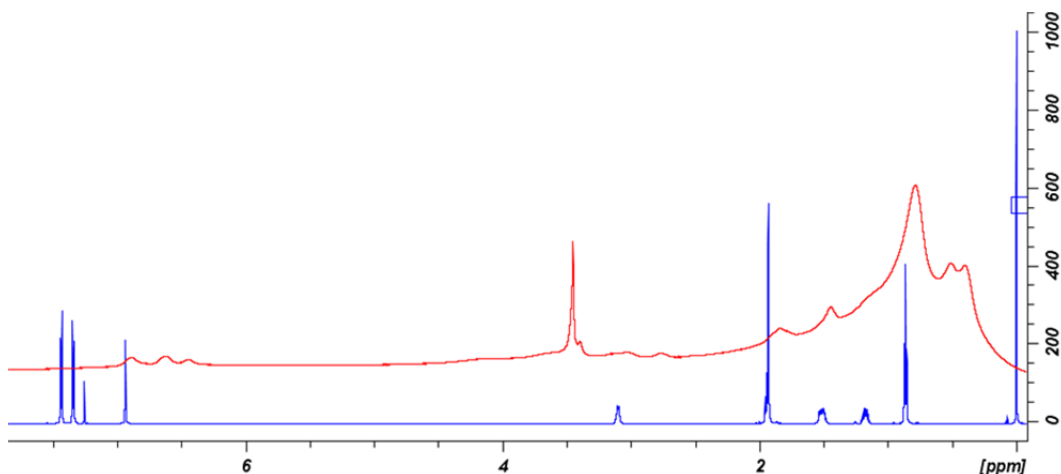


Abbildung 56: Überlagerung des isotropen (blau) und anisotropen (rot) Protonenspektrums des *p*-Brom-substituierten *trans*-Diethyl-DTC-Derivats. Deutlich sind die extremen Peak-Verbreiterungen, die Hochfeldverschiebung (zum Teil um mehr als 0.6 ppm) und das Polymerrestsignal im Bereich von 0 bis 2 ppm erkennbar.

Bestimmt man die Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittelsignals in der anisotropen Phase, so liegt diese bei ca. 100 Hz. Die Quadrupolaufspaltung blieb jedoch in den nachfolgenden Messungen nicht konstant. Nach jedem durchgeführten 2D-Experiment verbreiterten sich die beiden Äste des Lösungsmittelsignals im Deuteriumspektrum zusehends bis sie schließlich kaum noch zu erkennen waren. Da wie zu erwarten auch die anisotrop gemessenen zweidimensionalen Spektren qualitativ sehr

schlecht waren, aus dem HETLOC^{132,133} konnten zum Beispiel gar keine Kopplungen extrahiert werden, wurde mit diesem Derivat nicht mehr weiter gearbeitet.

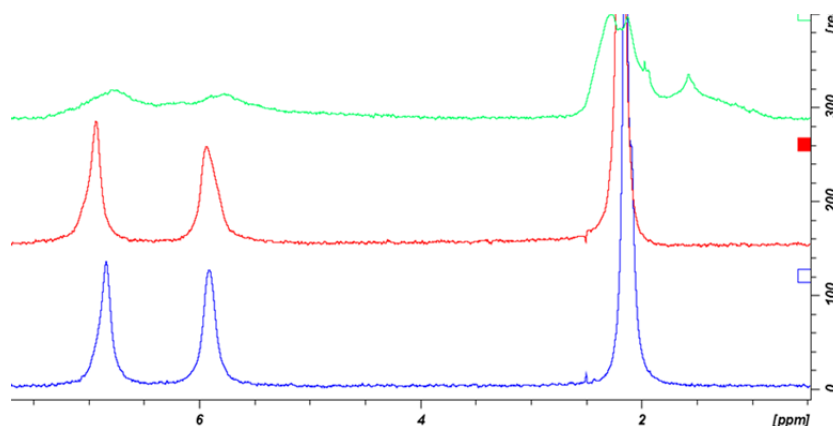


Abbildung 57: Änderung der Quadrupolaufspaltung des Lösungsmittelsignals in PA. Zwischen den einzelnen Spektren (blau-rot-grün) liegen je etwa 12 Stunden.

Wir entschieden uns für das (*trans*-Dimethyl)-DTC-Derivat, welches den positiven Nebeneffekt hat, dass zusätzlich zwei Methylgruppen vorliegen, welche zusätzliche RDC-Daten liefern. Die nachfolgenden NMR-Experimente wurden in zwei verschiedenen Alignment-Medien in CDCl₃ durchgeführt. Zum einen wurde wieder wie beim Bromderivat PA¹⁰⁷ (130 mg Valin-PA-Derivat und 550 mg CDCl₃) verwendet, welches nach der Präparation und kurzen Äquilibrationszeit diesmal eine über die ganze Zeit hinweg eine stabile Quadrupolaufspaltung von 45 Hz ausbildete. Des Weiteren wurde ein PBLG-Stick¹²³ (Abmessungen L= 16mm und D= 2.3 mm) verwendet, der mehrere Wochen bei 40°C in einem 5mm NMR-Röhrchen quoll bis sich eine stabile Quadrupolaufspaltung von 85 Hz ausbildete.

Da auch dieses DTC-Derivat aufgrund der Molekülsymmetrie nur einen Signalsatz im Spektrum lieferte, mussten neben dem standardmäßig durchgeführten CLIP-HSQC-Experiment¹²⁷ noch weitere Experimente durchgeführt werden um ausreichend Kopplungen für die RDC-Analyse zu erhalten, da aus den anisotropen PBLG-Stick und PA-Spektren nur jeweils 5-¹T_{CH}-Kopplungen bestimmt werden konnten. Neben dem HETLOC-Experiment^{132,133}, aus dessen anisotropen Spektren konnte je Medium eine weitere ⁿT_{CH}-Kopplung ermittelt werden, wurde hier erstmals auch ein 1,1 ADEQUATE-Experiment^{37,38} bei einem kleinen Molekül in anisotroper Phase aufgenommen, aus dem ¹T_{CC}-Kopplungen extrahiert werden konnten. Aufgrund der langen Messzeit von fast zwei Tagen wurde dieses Experiment nur im PBLG-Stick durchgeführt. So konnten letztendlich zwei weitere Kopplungen ermittelt werden, sodass die nachfolgende RDC-Analyse mit insgesamt 8 RDCs durchgeführt werden konnte. Das isotrope und anisotrope Spektrum und die Extraktion der Kopplungen ist in Abbildung 58 ausführlich gezeigt.

Mit Hilfe der ermittelten RDC-Kopplungen konnte die helikale Vororientierung des (*trans*-Dimethyl)-DTC-Derivats bestimmt werden. Die Hauptkonformation liegt als a-p (P*, S*, S*) vor. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Röntgenstrukturanalyse. Zusätzlich konnte KOLMER mit quantitativen NOE-Messungen das Konformerengleichgewicht auf der Basis der ermittelten Molekülgeometrien bestimmen. Die Konformerenpopulationen entspricht dabei etwa 83-92 %. Alle Ergebnisse und Schlussfolgerungen bezüglich des diastereoselektive Schaltverhalten und der Verteilung der Konformere sind in der nachfolgenden Veröffentlichung detailliert beschrieben. Die verwendeten

Messdaten und durchgeführten Methoden sind in Kapitel 6.3 in der entsprechenden Supporting-Information dargestellt und beschrieben.

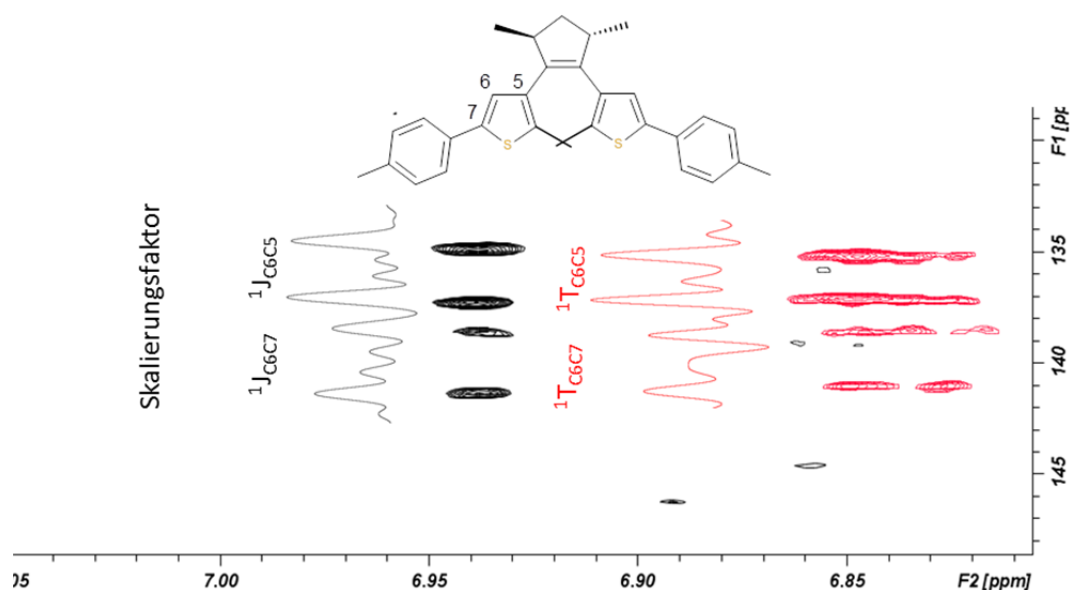


Abbildung 58: Bestimmung der $^1J_{C-C}$ und $^1T_{C-C}$ -Kopplungskonstante aus einem isotropen (schwarz) und anisotropen (rot) 1,1-ADEQUATE- Spektrum von Dithienylcyclopentenderivates. Obwohl die anisotropen Kopplungen sehr breit sind, können die totalen Kopplungskonstanten präzise entnommen werden. Die $^1J_{C-C}$ -Kopplungen sind immer positiv. Somit ergeben sich im Fall schwacher Orientierung der Betrag und das Vorzeichen von $^1D_{C-C}$, analog zum CLIP/ CLAP-HSQC, direkt aus der Änderung der Linienaufspaltung.



Conformational Analysis

Exploring the Conformational Space of Bridge-Substituted Dithienylcyclopentenenes

Maic Fredersdorf,^[a, b] Robert Göstl,^[c, d] Andreas Kolmer,^[a] Volker Schmidts,^[a] Peter Monecke,^[b] Stefan Hecht,^{*,[c]} and Christina M. Thiele^{*,[a]}

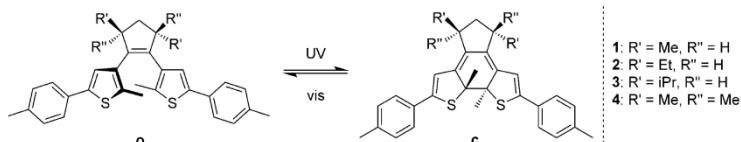
Abstract: Stimuli responsive compounds and materials are of high interest in synthetic chemistry and materials science, with light being the most intriguing stimulus due to the possibility to remote control the physicochemical properties of a molecule or a material. There is a constant quest to design photoswitches with improved switching efficiency and especially diarylethene-type switches promise photo cyclization quantum yields up to unity. However, only limited attention has been paid towards the influence of the

solution conformation on the switching efficiency. Here, we describe a detailed NMR spectroscopic investigation on the conformational distribution of bridge-substituted dithienylcyclopentenenes in solution. We could discriminate between several photoactive and photoinactive as well as two diastereomorphous conformations and show that the trends observed in the switching efficiency match the conformer populations obtained from state of the art NMR parameters in solution.

Introduction

The continuous attraction to photochromic molecules underlines their great potential to control diverse functions and processes on the molecular scale by using light and hence resolved in time as well as in space.^[1–3] As highly fatigue resistant P-type photochromes, diarylethenes (DAEs) have been proven interesting candidates for a number of photocontrollable applications ranging from molecular motion over catalysis to memories.^[4–9] However, the already superior switching efficiency still needs to be improved for

non-academic applications demanding basically infinite switching cycles, that is, high fatigue resistance and large photo-cyclization quantum yields (Φ_{oc}).^[10–15] We recently established a synthetic protocol for the bridge-substitution of dithienylcyclopentenenes and recorded a significant increase in the Φ_{oc} value for the substituted derivatives 1–4 (Scheme 1).^[16]



Scheme 1. Ring-opened (o) and ring-closed (c) forms of the bridge-substituted dithienylcyclopentenenes 1–4.

[a] M. Fredersdorf,* A. Kolmer, Dr. V. Schmidts, Prof. Dr. C. M. Thiele
Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität Darmstadt, Alarich-Weiss-Strasse 4
64287 Darmstadt (Germany)
E-mail: cthiele@thielelab.de

[b] M. Fredersdorf,* Dr. P. Monecke
Department of Chemistry, Sanofi Aventis Deutschland GmbH
Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt am Main (Germany)

[c] Dr. R. Göstl,* Prof. Dr. S. Hecht
Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin
Brook-Taylor-Strasse 2, 12489 Berlin (Germany)
E-mail: sh@chemie.hu-berlin.de

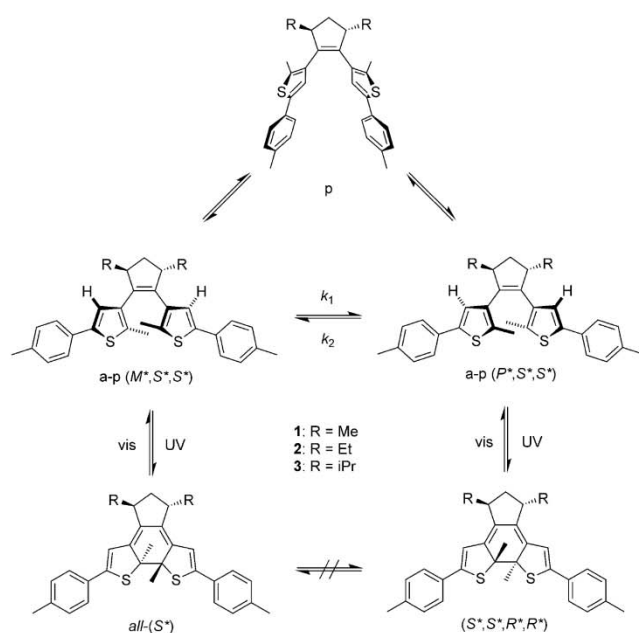
[d] Dr. R. Göstl*
Present address: Technische Universiteit Eindhoven
Molecular Science and Technology
group Supramolecular Polymer Chemistry
P.O. Box 513, 5600 MB Eindhoven (The Netherlands)

[*] These authors contributed equally.

Supporting information for this article is available on the WWW under
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201501842>.

As it is generally believed that the distribution between the anti-parallel (a-p) and parallel (p) conformations correlates to the Φ_{oc} value due to the Woodward–Hoffmann rules,^[4] it is reasonable to rationalize the underlying driving force by determination of the fraction of a-p conformers in the ring-opened form. Inexpediently and as opposed to benzothiophene-substituted DAEs, direct measurement of this fraction is analytically very demanding for dithienylcyclopentenenes if simple freezing of the conformational isomers through variable-temperature ¹H NMR spectroscopy^[10,11,16] does not lead to unambiguous results or if there is more than one a-p conformation involved.

In fact, it can be seen in Scheme 2 that the dithienylcyclopentenenes 1–3 do not only interconvert between the a-p and p conformations but that also the a-p conformation itself is in a dynamic equilibrium between two helically pre-oriented species, that is, a-p (*P**,*S**,*S**) and a-p (*M**,*S**,*S**). The latter interconversion leads to a discrimination between the ring-opened



Scheme 2. Conformational isomers of the ring-opened and diastereomers of the ring-closed bridge-substituted dithienylcyclopentenes **1–3**. The other pair of enantiomers are omitted for the sake of simplicity.

a-p conformers and thus yields a distinct diastereomeric excess (*de*) after the photocyclization to the ring-closed isomers. Certain derivatives, previously described in the literature, could reach *de* values as large as 99%.^[17] Without doubt, measuring the *de* of a photocyclization process can be performed easily through conventional liquid chromatography. However and most importantly, assignment of an unambiguous structure to the major ring-closed diastereomer is by far more demanding. To the best of our knowledge, until now only in one case the thermodynamically more stable ring-opened helically pre-oriented conformation could be determined in the crystalline phase by X-ray structural analysis,^[18] which is a strong hint for the behavior of the molecule in solution but certainly requires a more thorough investigation with regard to the liquid phase. In solution, apart from the photochemically active conformations, other conformations might also be populated and required in the formal description of the cyclization mechanism. It is thus not only highly desirable to develop a method for the determination of the ratio between the a-p and p conformers to gain insight into the mechanism dictating the Φ_{oc} value but at the same time to use this method for identification of the major helically pre-oriented a-p conformer giving rise to a distinct *de* during the photocyclization process in solution.

Most configurational and conformational investigations on small organic molecules involve analysis of NMR observables such as the determination of scalar coupling constants [$^3J(\text{H,H})$],^[19] distance measurements based on the nuclear Overhauser enhancement (NOE),^[20–22] as well as more recently

residual dipolar couplings (RDCs). These become observable by orienting the molecule of interest in a suitable weak alignment medium.^[23–26]

In this work, we combine the analysis of the switching behavior in solution with NOE and RDC measurements to illuminate the overall underlying conformational equilibrium of the dithienylcyclopentenes **1o–4o**. Thus, by obtaining a deeper insight into cyclization and cycloreversion quantum yields we disclose the peculiarity of this diastereoselective photochemical event.

Results and Discussion

Analyzing the switching performance

The photochemistry of the dithienylcyclopentenes **1–3** has been studied extensively by us in earlier work.^[16] Despite increasing the steric demand of the respective alkyl substituents in the bridge moiety (from Me over Et to *i*Pr), the cyclization quantum yields Φ_{oc} remain at values of 0.6 and the cycloreversion quantum yields Φ_{co} are unchanged with a value of 0.01.

The diastereoselective photocyclization was followed by analytical liquid chromatography and clearly shows that a major ring-closed diastereomer **1c1** and a minor ring-closed diastereomer **1c2** is formed during the course of the irradiation of compounds **1–3** (Figure 1). The diode array detector (DAD) trace was integrated at the isosbestic point and the *de* was calculated over the course of the irradiation (Figure 2) for compounds **2** and **3**. For DAE **1** the separation of the bands of **1c1** and **1c2** was only successful at the photostationary state (PSS) and hence only one data point could be collected. Two main aspects can be extracted from Figure 2a: 1) the values obtained for the diastereomeric excess during the ring-closing process of compounds **1–3** are practically identical within the margin of error with values from 82–84%, and 2) the *de* values are constant throughout the course of the irradiation. The latter finding is in agreement with the reasonable assumption that the equilibration between the two helically pre-oriented species a-p (P^*, S^*, S^*) and a-p (M^*, S^*, S^*) is rapid at room temperature.

However and interestingly, for the cycloreversion of **3c** to **3o** the *de* decreased during the course of the irradiation, suggesting that the abundant amount of **3c1** is depleted more rapidly than the amount of **3c2** (Figure 2b). Regarding the photokinetic rate law, this can only mean that the product of the molar absorptivity and the cycloreversion quantum yield of the major closed form **3c1**, $\epsilon_{3c1} \times \Phi_{3cd}$ is different from that of minor closed form **3c2**, that is, $\epsilon_{3c2} \times \Phi_{3cd}$. Although the preparative separation of the two diastereomers was not successful, an insight into the underlying reasons for the faster cycloreversion reaction of **3c1** could be gained by comparing the UV/Vis absorption spectra of the closed forms recorded by the diode array detector after analytical liquid chromatographic separation of the irradiated solution at the PSS (Figure 3a). It

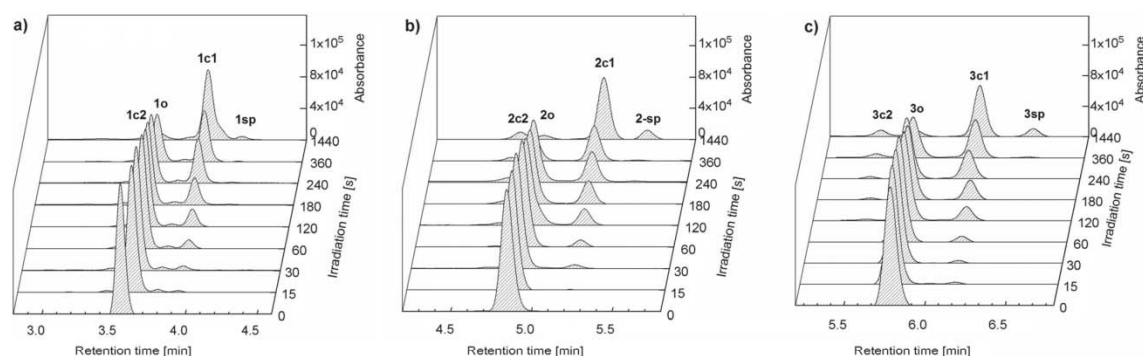


Figure 1. Evolution of the concentrations of the open form **o**, the closed forms **c1** and **c2**, and the side product **sp** during the course of irradiation of a 10^{-5} M MeCN solution of a) compound **1**, b) compound **2**, and c) compound **3** with $\lambda = 313$ nm light as observed through the diode array detector signal at the isosbestic point of ultra-high performance liquid chromatography traces.

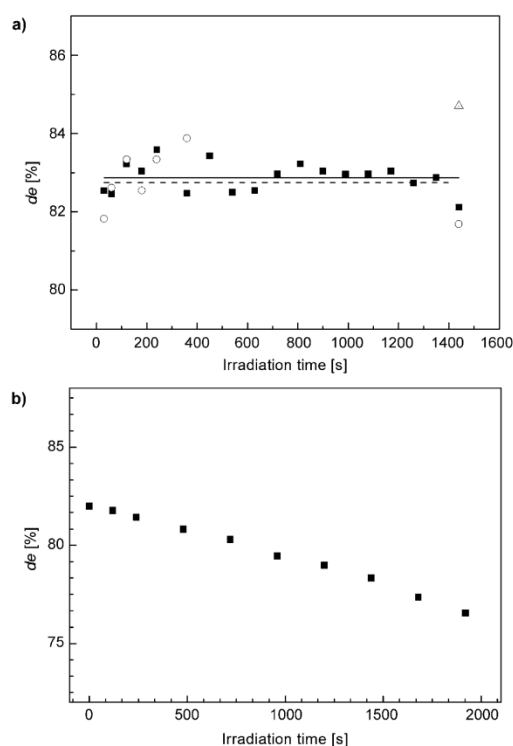


Figure 2. Evolution of the *de* values during the course of irradiation of a 10^{-5} M solution in MeCN. a) Photocyclization of diarylethenes **1o-3o** by irradiation with light of $\lambda = 313$ nm (■: *de* of **3c1** (— = linear fit), ○: *de* of **2c1** (--- = linear fit) △: *de* of **1c1**), b) cycloreversion of diarylethene **3c1** by irradiation with light of $\lambda = 546$ nm (■: *de* of **3c1**).

becomes clear that the minor diastereomer **3c2** exhibits a hypsochromic shift of its absorption maximum in the visible part of the spectrum of about 30 nm as compared to the maximum of **3c1**. Hence, it is only coherent to assume that the absorptivities ϵ_{3c1} and ϵ_{3c2} are different at the wavelength employed for the cycloreversion reaction ($\lambda_{irr} = 546$ nm) and that the diastereomer absorbing less light at this wavelength ring-opens

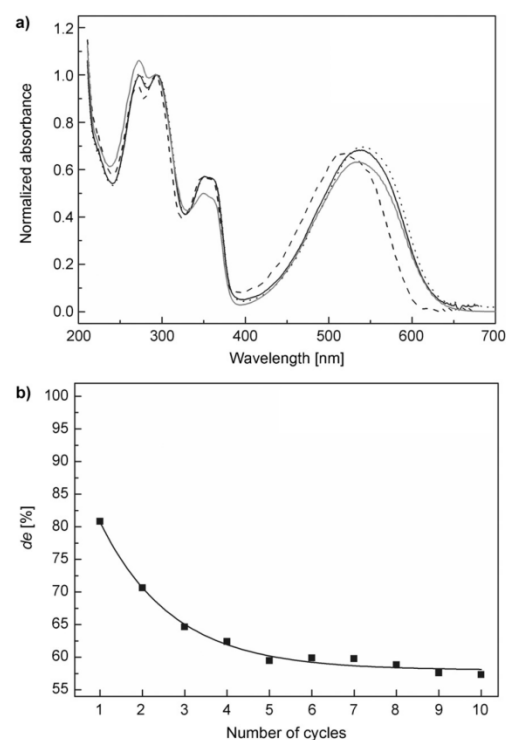


Figure 3. Comparing the absorption spectra of the different closed forms **3c1** (.....) and **3c2** (-----) obtained by the diode array detector after ultra-high performance liquid chromatography in reference to the calculated (—) and actually measured (—) superposition of the diastereomers **3c**. The spectra are normalized to the absorption at $\lambda = 294$ nm. b) Evolution of the *de* of **3c1** (■, — = exponential fit of the *de*) over multiple switching cycles employing light of $\lambda = 313$ nm for the cyclization from **3o** to **3c** and $\lambda = 546$ nm for the cycloreversion from **3c** to **3o** at a concentration of 3×10^{-5} M in MeCN. The cycloreversion reactions were stopped each after approximately 50% depletion of the combined ring-closed forms **3c1** and **3c2**.

more slowly. Furthermore, a superposition of the individual absorption spectra of **3c1** and **3c2** weighted by their relative

occurrence at the PSS (83% of **3c1** and 17% **3c2**) yields a superimposed absorption spectrum strongly resembling the originally determined spectrum at the PSS.

This assumption is supported by the comparison of the computed ring-closed geometries of **1c1** and **1c2**,^[27] in particular the torsion angles within the conjugated double-bond system. Compound **1c2** exhibits a much higher ring strain than **1c1**, which could be the reason for the hypsochromic shift of the absorption maximum of compound **1c2** (see Figure 3a).

As a consequence, compound **1c1** would absorb much more light than compound **1c2**, under the postulation that the value of Φ_{co} is equal for both species as the molar absorptivity would be different, and therefore the cycloreversion reaction from **1c1** to **1o** would be faster, resulting in a depletion of **1c1** and an enrichment of **1c2**.

Exactly this behavior of ring-closing with a constant *de* and a ring-opening with a depleting *de* can then be exploited altogether to change the overall *de* in solution over multiple switching cycles (Figure 3b). Over as many as ten switching cycles from structure **3o** to structure **3c** and vice versa, it was possible to deplete the *de* of **3c1** from 82 to 55% only by consecutively irradiating the sample with light of alternating wavelengths.

A hint to which diastereomer **1c1–3c1** is the most prevalent was gathered by synthesizing the bromo-substituted dithienylcyclopentene **5** (Figure 4a). This species was designed to bear

form. Additionally, packing effects in the solid state could result in a geometry, which is not representative of the conformational ensemble in solution.

Resolving the conformational ensemble by NMR spectroscopy

To explore the conformational (a-p vs. p) space and its relation to the diastereoselective switching in solution, we chose to further investigate the dithienylcyclopentene **1o** by using variable-temperature (VT) NMR, NOE and RDC measurements. The choice of compound **1o** instead of compound **3o** (used in the analysis of the switching performance) and compound **5o** (used in the X-ray analysis, see Figure 4) is due to both methyl groups of the cyclopentene ring of compound **1o**, which provide an additional dipolar carbon–carbon coupling in the RDC measurements, which strongly aids subsequent RDC analysis.

In analogy to the approach used in the previous study of compound **4**,^[16] we started by recording variable-temperature ¹H NMR spectra of compound **1o** (Scheme 1). Unfortunately, we were unable to quantify the conformer populations by using this method. Only the thienyl protons and the methyl groups showed a slight linear chemical shift of about 0.1 ppm upon lowering the temperature from 300 to 230 K,^[27] whereas the other chemical shifts remained unchanged within the experimental errors (<0.05 ppm). A non-linear shifting of the proton signals, which could be used to estimate the ΔG^\ddagger values of the parallel versus anti-parallel equilibrium^[30,31] could not be observed in the VT measurements of compound **1o**.

Similarly, the analysis of the scalar coupling constants did not provide further results, as a connection of the interacting nuclei over a few chemical bonds and parameterization of the dihedral angle through a Karplus-type relation are required. The high content of quaternary centers in compounds **1o–3o** interrupting the coupling pathway, as well as the a priori unknown parameterization for such systems, prevent the use of scalar couplings in the analysis of the dithienylcyclopentenenes. Therefore, we extended the investigations of the conformational equilibria in the dithienylcyclopentenenes to include the distance and orientational information from NOE and RDC measurements, respectively.

Computational investigation of the conformational space and considerations of molecular symmetry

As a first step, structural models of compound **1o** were generated by a conformational search by using molecular modeling (Maestro, Schrödinger suite 2012, OPLS force-field, solvent CHCl₃).^[27] A total of twenty unique, low-energy conformations could be identified, of which only eight show major differences in the torsion of the thienyl moiety with respect to the cyclopentene core. Within these conformations, the cyclopentene core is not planar, but is suggested to adopt two “envelope” conformations. Thus, we arrived at four geometries (i.e., geometries A–D in Figure 5), each with a corresponding ring-flipped envelope conformation (A'–D', indicated by an orange arrow in Figure 5). When comparing the calculated structures

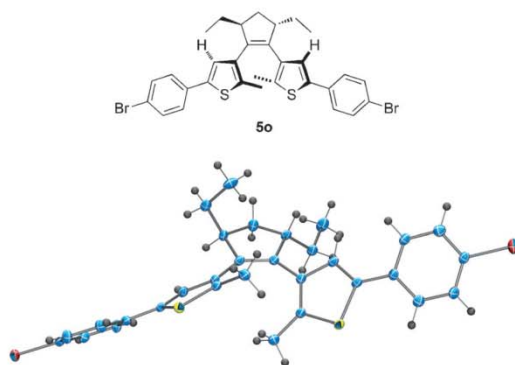


Figure 4. Ring-opened form of DAE **5**. Molecular formula (top). ORTEP plot^[28] of the molecular structure in the crystal (CCDC-1029699,^[29] ellipsoids are drawn at the 50% probability level, bottom).

heavy bromine atoms to introduce a better crystallization capability into the molecule and to facilitate the determination of the X-ray crystal structure. Indeed, compound **5o** was crystallized successfully and the molecular structure was determined (Figure 4b). It can clearly be seen that the helically pre-oriented ring-opened form of compound **5o** in the crystal corresponds to the a-p (*P**,*S**,*S**) form. This indicates that the relative configuration of **5c** is *S**,*S**,*R**,*R** (see Scheme 2) but is certainly no definite proof because kinetic effects could also favor the crystallization of the thermodynamically less stable

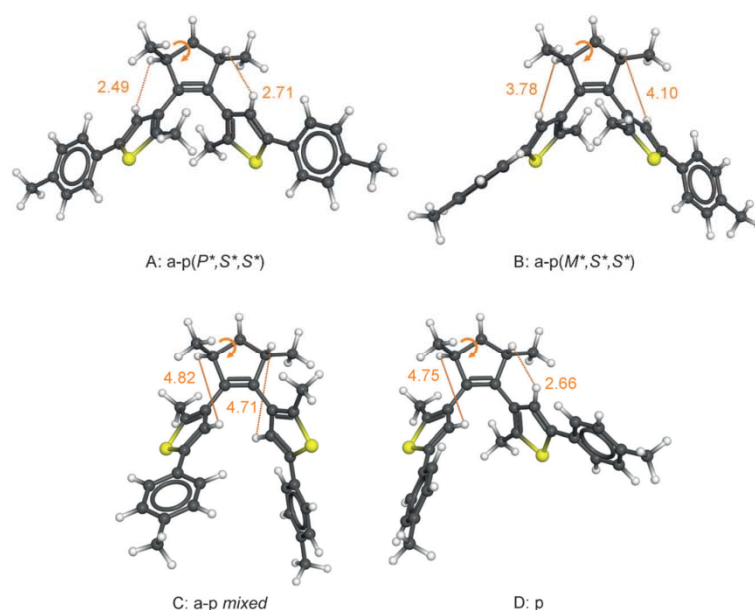


Figure 5. Geometries of the low-energy conformers of the dithienylcyclopentene derivative **1o**. The a-p-conformations [A, i.e., a-p (P^*,S^*,S^*) and B, i.e., a-p (M^*,S^*,S^*)] are shown on top, the a-p mixed and p conformation (i.e., C and D, respectively) on the bottom. The different interproton distances between the cyclopentene and thiophene moieties are highlighted in orange [Å]. The arrows indicate the flexibility in the cyclopentene core, leading to the respective conformers A', B', C', and D'.

to Scheme 2, conformer A is in accordance to the aforementioned a-p (P^*,S^*,S^*) form and conformer B to the a-p (M^*,S^*,S^*) form. Conformer C is a mixed geometry, and although inactive in terms of a Woodward–Hoffmann-allowed photocyclization, the conformer might be populated in solution and therefore should be compared to the experimental data as well. Lastly, conformer D corresponds to the p conformation shown in Scheme 2. The rotation of the phenyl rings has been ignored in the conformational selection process, because these do not contribute to the NOE- and RDC-based conformational analysis of the central moieties.

To characterize this system further, the eight geometries were subsequently re-optimized by using density functional theory calculations (B3LYP/6-311+G(d,p), IEFPCM model for CHCl_3 solvent, Gaussian 09).^[27] The nature as a local minimum for each geometry was confirmed by vibrational frequency analysis, also giving access to the relative Gibbs free energies calculated from thermochemistry. Based on these calculations, the a-p (P^*,S^*,S^*) geometry clearly has the lowest computed energy. The other a-p conformers are 6.8 [a-p (M^*,S^*,S^*)] and 5.2 kJ mol^{-1} (a-p mixed) higher in energy, whereas the p conformer (averaged over both ring-flipped conformers) is 5.3 kJ mol^{-1} higher in energy.^[32] The change in the envelope conformation of the cyclopentene core does not change the energy significantly, as the respective differences in energies are usually less than 0.5 kJ mol^{-1} .^[33] Although the computed energies are only rough estimates within the confines of the chosen method, they match well with the trends observed in other, experimental methods (see below).

Based on the observation of one signal set in the experimental spectra, we believe the ring-flip from conformer A into A' (similarly for the other conformers) to be fast on the timescale of the NMR experiment, leading to a pseudo- C_2 -symmetric ensemble of 50% conformer A and 50% conformer A' (denoted A–A', B–B', and C–C' accordingly), whereas the respective parallel D–D' ensemble is part of the C_s point group. Subsequently, the stereodiscrimination during the switching event should not be influenced by this process.

In an isotropic solution the rapid interconversion of the envelope conformations leads to a reduced set of observables in the NMR analysis, as chemical shifts and J couplings are only determined for non-equivalent sites. In the case of the NOE, only an average of the distance of interacting nuclei on both sides of the molecules is experi-

mentally accessible.^[22] In an anisotropic environment, the molecular symmetry often reduces the number of independent order parameters or imposes the restrictions on the choice of the molecular frame for some specific point groups.^[34,35] In the special case of a chiral alignment medium however (as used in this study) for both C_2 - and C_s -symmetric molecules, the effective molecular symmetry is reduced to C_1 .^[35] This allows for the same mathematical treatment of C_s and C_2 as for C_1 , and thus the same software could be used in the analysis of the RDCs in these molecules. As indicated in Figure 5, the ring-flip averaged distances between the single protons of the cyclopentene moiety and thiophene rings vary greatly. A main distinctive feature is the rather small interproton distance of averaged 2.58 Å in the A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] ensemble. All other computed ensembles clearly show larger averaged distances up to 4.75 Å (in the case of the a-p mixed ensemble C–C').

Determination of the conformer populations from averaged NOE distances

From quantitative measurements of the interproton distances by nuclear Overhauser enhancement (NOE) experiments,^[36–39] we should therefore be able to distinguish between the conformations of compound **1o**. We obtained distances from a mixing time series of 1D PFGSE NOE experiments^[40–42] with suppression of zero-quantum artifacts,^[43–45] by using the PANIC approach.^[46,47]

As reference distance, the distance between the protons from the methyl group located at the cyclopentene ring (H60–

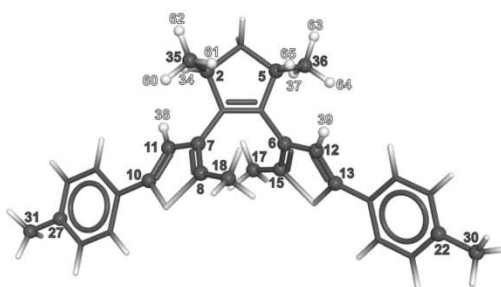


Figure 6. Atom numbering and graphical display of the extracted RDCs of DAE **1o**, which were used for both pseudosymmetric sides of the molecule.

H62/H63–H65, numbering scheme see Figure 6) and the proton next to this methyl group (H34/H37) was chosen. All six distances were extracted from the calculated geometry of conformer A. An averaged distance was then determined by using Tropp averaging,^[48] leading to a calibration distance of 2.646 Å. With this method, an interproton distance between the cyclopentene (H34/H37) and thiophene rings (H38/H39) of (2.62 ± 0.1) Å was determined. This distance is in surprisingly good accordance with the distance observed for conformers A or A' in Figure 5.

To evaluate whether other conformers are present in solution, we performed a conformational analysis by using the software WEEDHEAD.^[27,49] To create the symmetry of the molecule, the populations of conformers A and A' (as well as B–B', C–C', and D–D', respectively) were always set equal. The best fitting agreement is found if the A–A' ensemble is populated between 83 and 91 %. The remaining 9 to 17 % could either be B–B', C–C', or D–D' as well as a mixture of all those conformers.

Cross-validation of the conformational ensemble with residual dipolar couplings

As the NOE analysis was performed with only one single distance and the evaluation of other distances failed due to signal overlap and large experimental errors, we used residual dipolar couplings to confirm and widen the results. The RDCs provide (relative) orientational information of coupled nuclear spins in remote, non-interacting fragments of the molecule, by relating individual couplings to a global property of the solute, that is, its time-averaged orientation in the alignment medium with respect to the reference frame of the external magnetic field.^[25]

The established procedure to extract orientational information from RDCs is the order matrix analysis.^[50,51] A set of structure proposals is generated with for example, computational methods, and each structure is fitted separately to the experimental RDCs, yielding an alignment tensor. This tensor can be employed to check the given model for self-consistency. The model with the best fit between the calculated and the measured RDCs can be considered as the correct one. In recent years, this method has successfully been employed in the determination of the relative configuration of stereogenic centers

in rigid compounds.^[52–57] As each conformer is treated as a rigid geometry and related to a distinct tensor, we refer to this method as the single-conformer–single-tensor fit (SCST).

When investigating flexible molecules like the dithienylcyclopentenes (see Scheme 2), the situation is different because a second motional process must be considered in the RDC analysis. In addition to the tumbling motion of the entire molecule in the medium, as it is also the case in rigid molecules, the internal conformational mobility also has to be taken into account. A common way to describe this is to use an ensemble of conformers as a model for the structure proposal in the RDC calculation.^[26,58] In the generalized approach, each structure of the conformer ensemble is described with a distinct alignment tensor (multi-conformer–multi-tensor fit, MCMT).^[59,60] Although this allows for a general treatment, the disadvantage of this method is the rather large amount of experimental RDCs required to determine each alignment tensor. This problem can be circumvented by assuming a single common alignment tensor for the whole ensemble of structures (multi-conformer–single-tensor fit, MCST). Similar to the SCST approach, only six linearly independent RDCs are needed in the MCST, however special care has to be taken in the choice of a common molecular frame.^[61,62] Analysis of the MCST fit again relies on the back-calculation of the RDCs and comparison to experimental values to find the best-fitting one. Investigations into the applicability of the approximations introduced in the MCST approach are still ongoing. However, there are a few recent examples, where the MCST fit method was successfully applied to the RDC analysis of conformationally flexible molecules.^[59,60,63]

As the investigated compound shows a reduced set of signals due to its symmetry, it is essential to obtain as many RDCs as possible. Thus we used in addition to the established (CLIP)-HSQC^[64] and HETLOC^[65,66] experiments, the *J*-modulated 1,1-ADEQUATE^[67,68] experiment for the determination of one-bond carbon–carbon couplings. Due to the low natural abundance of ¹³C and the challenging measurements in anisotropic environments, there are very few examples of RDC analyses making use of these couplings in non-isotopically labeled small molecules.^[69,70] To the best of our knowledge this is the first application of the *J*-modulated 1,1-ADEQUATE experiment in anisotropic media. Without the additional couplings, the RDC analysis would not be applicable, as only an insufficient number of experimental couplings would be available for the fitting procedure.

We aligned a racemic mixture of dithienylcyclopentene **1o** in weak alignment media, being 1) a cross-linked poly- γ -benzyl-L-glutamate (PBLG) gel^[71] and 2) a valine-polyacetylene derivative (PA)^[72] in CDCl₃, to obtain the anisotropic total couplings *T*. The enantiodiscriminating properties of the homochiral phases of 1) and 2) noticeable in line broadening in the anisotropic spectra did not disturb the reliable extraction of the *T*-couplings from the spectra.

A total of five ¹D(C,H), containing the calculated ¹D(C,C) from the three methyl groups, one long-range ²D(C,H) and two ¹D(C,C) couplings including their relative signs, could be extracted from the isotropic as well as from the anisotropic spec-

Table 1. Dipolar couplings and their experimental errors as measured for DAE **1o** in PBLG gel/ CDCl_3 .

Coupling nuclei	RDC [Hz]	Error [Hz]
C2–H34 (C5–H37) ^[a]	–8.44	0.7
C11–H38 (C12–H39) ^[a]	10.98	0.6
C35–H34 (C36–H37) ^[b]	3.18	0.7
C2–C35 (C5–C36) ^[c]	1.64	0.2
C8–C18 (C15–C17) ^[c]	–1.56	0.2
C27–C31 (C22–C30) ^[c]	–2.70	0.2
C11–C7 (C12–C6) ^[d]	–3.05	1.0
C11–C10 (C12–C13) ^[d]	–1.29	0.7

[a] Determined from CLIP-HSQC.^[64] [b] Determined from HETLOC.^[65,66]
[c] The respective C–H RDC was determined from a CLIP-HSQC experiment and subsequently converted to the C–C RDC according to Verdier et al.^[70] [d] Determined from *J*-modulated 1,1-ADEQUATE.^[67,68]

tra. The experimental RDCs from the aligned PBLG gel sample are shown in Table 1 (numbering scheme see Figure 6). The RDCs obtained from the anisotropic polyacetylene phase are given in the Supporting Information.

For the conformer ensemble analysis we used the RDC module of the software hotFCHT.^[58,73] To reflect the molecular symmetry in the calculation of the order tensor, the RDCs of symmetry equivalent couplings were set to the same value. By using any of the calculated structure models in a SCST fit, the quality factor^[74] of all models was very poor (best fit $Q=0.490$), which is indicative of conformational flexibility.

Combining the conformers from Figure 5 with the opposite cyclopentene ring-flip yielded the four ensembles A–A', B–B', C–C', and D–D', the MCST approach led to an ensemble with a good representation of the experimental RDC data. Although the *Q* factors of the ensembles B–B' [a-p (M^*,S^*,S^*)], C–C' (a-p mixed), and D–D' (parallel) are weak ($Q>0.35$), the ensemble A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] represents the experimental RDCs very well resulting in a *Q* factor of 0.100 at a conformer population of 50% of conformer A and 50% of conformer A'.^[27]

In this ensemble, only the experimental carbon–carbon coupling of C11–C10 in the thiophene rings differs in its calculated coupling of (0.08 ± 0.1) Hz from its experimental value of (-1.29 ± 0.7) Hz. All other seven couplings are within the experimental error.

The same results are achieved by using PA as alignment medium. Although the degree of order in PA is significantly weaker than in the PBLG gel resulting in smaller dipolar couplings—some are in the range of the measurement error—the ensemble A–A' [a-p (P^*,S^*,S^*)] gives the best representation of the experimental data. A more detailed view of the PA measurements can be found in the Supporting information.

Although this analysis establishes the description of flexibility in the five-membered ring, the rotation along the C–C bond connecting the thiophene moiety and the central ring has to be studied further. Hence, we pairwise combined the above-described conformers in an ensemble by using the MCST approach to determine the conformational distribution between A–A'/B–B', A–A'/C–C', and A–A'/D–D'.

However, no distinct minimum in the conformational distribution can be found, (see Figure 7). As long as the population

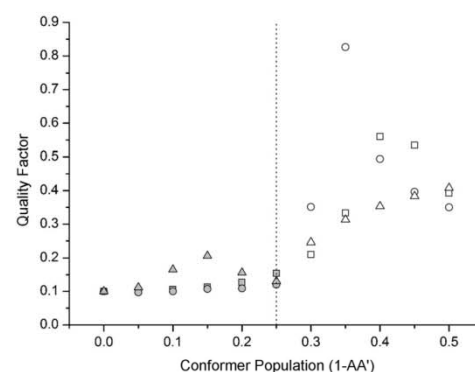


Figure 7. Dependence of the RDC quality factor of the four-conformer MCST fits as a function of the conformer population. Ensembles are generated by combining a sub-ensemble of equally populated A and A' with a corresponding sub-ensemble of B–B' (Δ), C–C' (\circ), and D–D' (\square), respectively, such that the sum of all populations is unity. As soon as the B–B', C–C', or D–D' ensembles exceeds 50% of the total population (marked by the dotted line) the *Q* factor worsens quickly (open symbols).

of the A–A' sub-ensemble is higher than 50% (25% of conformer A and 25% of conformer A'), the *Q* factor indicates a good fit (≈ 0.10). But as soon as the other conformers are populated to more than 50% (B–B' or C–C' or D–D'—each equally populated), the *Q* factor worsens quickly. Hence, we cannot exclude populations of the other conformer ensembles as the fit remains more or less equally well for up to 50%. However, when excluding the ensemble A–A' from the MCST calculations, all fits become worse ($Q>0.20$) regardless of the conformer population. The same result is obtained by combining all eight conformers. As soon as the conformers B–B', C–C', D–D' (each equally populated) are the majority ($>50\%$), the *Q* factor deteriorates.

Comparison of the conformer populations from the NOE/RDC data to the data from VT NMR spectroscopy

The results of the RDC data show that the major conformation populated in solution is the a-p (P^*,S^*,S^*) form. With a NOE-derived population of 83–91%, this conformation is the thermodynamically more stable helically pre-oriented ring-opened form of DAE **1o**. Based on the difference in the Gibbs free energy, statistical weights of 72% a-p (P^*,S^*,S^*), 7% a-p (M^*,S^*,S^*), 10% a-p mixed, and 10% of the p conformer can be estimated according to a Boltzmann distribution,^[27] which matches the population obtained from the NOE experiments surprisingly well.

This result is also in good accordance with the results from the X-ray crystallographic data of compound **5o**. Hence, it becomes even more reasonable to assume that the relative configuration of the major ring-closed diastereomer (**1c1**) corresponds to the S^*,S^*,R^*,R^* geometry.

Surprisingly, the population of the a-p conformer of compound **1o** determined in this study is very similar to the population of the a-p form of the tetramethyl bridge-substituted DAE **4o**, determined to be 81% by VT ^1H NMR spectroscopy,

whereas simultaneously exhibiting a photocyclization quantum yield of $\Phi_{oc} = 0.83$.^[16] The comparatively lower photocyclization quantum yield of $\Phi_{oc} = 0.6$ for compound **1**, while maintaining the same level of population of the a-p conformer around 80%, therefore might stem from additional effects beyond the scope of this work.

As we had hoped to find a more immediate relation of the a-p conformer population and the photocyclization quantum yield, we re-investigated the tetramethyl bridge-substituted DAE **4o**. When trying to reproduce the non-linear shifting of resonances previously observed in the VT ^1H NMR experiments, we were unable to find any non-linear shift. All resonances show a slight linear (but no non-linear) shift upon cooling of the sample. This is in contrast to the previously published data and may be explained by incorrect temperature calibration of the spectrometer in the previous work. However, from the changes in the signal pattern of the ^1H NMR spectra at different temperatures, we expect only the pseudo- C_2 -symmetric a-p conformer form to be populated at RT. This is based on the number of signals expected for the two protons in the five-membered bridge: the a-p conformation would lead to a pseudo- C_2 symmetry and the two protons become homotopic, whereas the p conformation would be pseudo- C_s symmetric and the two protons should be diastereotopic and give distinct NMR signals. As we only observe a single, sharp resonance over the whole temperature range, we rule out a significant population of the p conformation. Unless there is incidental isochronicity of resonances, we therefore presume the a-p conformation of compound **4o** to be exclusively populated at RT. We tried to corroborate this result by NOE measurements as detailed above for compound **1o**. Although we were able to quantify the NOE of interest from the bridge methyl groups to the thienyl proton, we were unable to reliably quantify another NOE correlation as reference. Without this reference, we were unable to estimate the population based on NOEs. The indications from the number of signals observed for compound **4o** in combination with expected symmetry point towards an exclusive population of the a-p conformation in compound **4o**. Performing DFT calculations as described above, we estimate a Boltzmann population of 92% of the a-p conformer versus 8% of the p conformer of compound **4o**. Thus, the trend observed for the photocyclization quantum yields goes into the same direction as the population of the a-p conformation in compounds **1o** and **4o**.

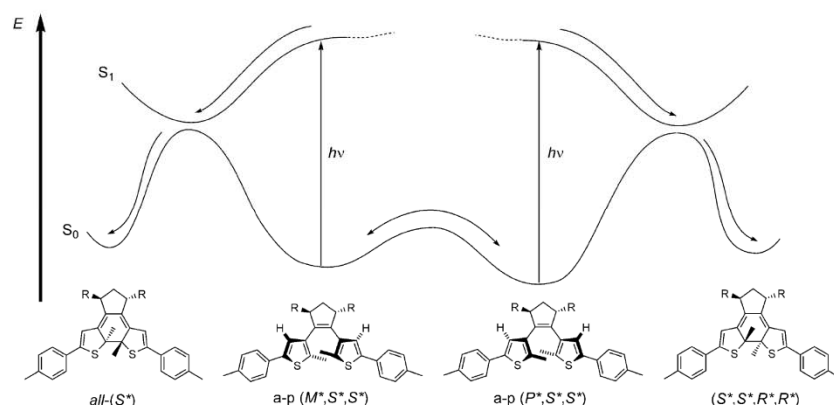
Conclusion

By combining different analytical methods, namely, UPLC-MS, X-ray crystallography, NOE, VT ^1H NMR spectroscopy, and RDC measurements, we could gain an

unprecedented insight into the stereoselective switching behavior of bridge-substituted dithienylethenes. X-ray crystallography on a distinct derivative revealed that the major helically pre-oriented form in the crystalline state is a-p (P^*,S^*,S^*) form suggesting (S^*,S^*,R^*,R^*) being the most prevalent form in the ring-closed form. RDC studies of compound **1o** revealed a similar conformation for the major open form as a-p (P^*,S^*,S^*). This is consistent with the NOE measurements, in which the distance between the single protons of the cyclopentene and thiophene rings fits well with the predicted average distance of the computed a-p conformer ensemble. Combined with DFT calculations, these results suggest that the a-p (P^*,S^*,S^*) form is the thermodynamically more stable and thus major conformer in the ground state as compared to the minor a-p (M^*,S^*,S^*) conformer. We attribute this to the steric repulsion between the β -thienyl protons and the alkyl substituents in the cyclopentene bridge moiety. However, the thermal barrier for their respective interconversion at room temperature was found to be small and hence the ratio of both conformers remains constant throughout the cyclization process. In view of the comparable photokinetic factors (product of the quantum yield and the molar absorptivity at the irradiation wavelength) of both ring-opened conformers, the ratio of the formed ring-closed diastereomers, that is, (S^*,S^*,R^*,R^*)/all- (S^*) , should also remain constant throughout the cyclization process. Therefore, the degree of diastereoselectivity is indeed predetermined by the conformer ratio of their ring-opened precursors as schematically depicted by a stylized potential energy diagram in Scheme 3.

However, as the ring-opening processes of the ring-closed diastereomers proceed at unequal rates due to dissimilar photokinetic factors caused by different absorption spectra, a net shift of the overall *de* in the irradiated solution could be induced over multiple switching cycles. By this means, we demonstrate for the first time that the ratio of two diastereomers can be controlled by employing subsequent irradiation cycles with UV and visible light.

Furthermore, it is quite intriguing that the conformer population in the ground state could be nicely correlated to



Scheme 3. Potential energy diagram for the interconversion of the a-p helically pre-oriented conformers of DAEs **1o–3o** and subsequent photoinduced cyclization to their respective closed-form diastereomers.

the trends seen in the observed cyclization quantum yields of DAEs 1–4 and thus reinforces the insight that only the a-p conformation can be regarded as photoactive.

Acknowledgements

We gratefully thank the chemistry department of Sanofi-Aventis Deutschland, Frankfurt (Germany), for measurement time on their NMR spectrometers. Generous support from the German Research Foundation (Research Unit FOR934 as well as SFB 658), the European Research Council (through 2010-SG_257041: "RDC@Catalysis" as well as 2012-SG_308117: "Light4-Function") is gratefully acknowledged. We thank the Center for Scientific Computing Frankfurt for providing computer time on FUCHS and PD Dr. Stefan Immel for helpful discussions.

Keywords: conformational analysis • NMR spectroscopy • NOE • photochromism • residual dipolar couplings

- [1] M. M. Russew, S. Hecht, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 3348–3360.
- [2] R. Göstl, A. Senf, S. Hecht, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 1982–1996.
- [3] B. M. Neilson, C. W. Bielawski, *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1874–1885.
- [4] M. Irie, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1685–1716.
- [5] H. Tian, S. J. Yang, *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 85–97.
- [6] M. Irie, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 1535–1542.
- [7] B. L. Feringa, W. R. Browne, *Molecular Switches*, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, **2011**.
- [8] M. Irie, T. Seki, Y. Yokoyama, *New Frontiers in Photochromism*, Springer, New York, **2013**.
- [9] H. Dürr, H. Bouas-Laurent, *Photochromism: Molecules and Systems*, Elsevier, Amsterdam, **2003**.
- [10] K. Uchida, E. Tsuchida, Y. Aoi, S. Nakamura, M. Irie, *Chem. Lett.* **1999**, 63–64.
- [11] S. Kobatake, K. Uchida, E. Tsuchida, M. Irie, *Chem. Lett.* **2000**, 1340–1341.
- [12] S. Kobatake, M. Irie, *Chem. Lett.* **2003**, 32, 1078–1079.
- [13] S. Fukumoto, T. Nakashima, T. Kawai, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5047–5053.
- [14] S. Fukumoto, T. Nakashima, T. Kawai, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 1565–1568; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 1603–1606.
- [15] S. Z. Pu, C. H. Zheng, Q. Sun, G. Liu, C. B. Fan, *Chem. Commun.* **2013**, 49, 8036–8038.
- [16] R. Göstl, B. Kobin, L. Grubert, M. Pätz, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 14282–14285.
- [17] T. Yamaguchi, K. Uchida, M. Irie, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 6066–6071.
- [18] Y. Yokoyama, H. Shiraishi, Y. Tani, Y. Yokoyama, Y. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7194–7195.
- [19] M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 11–15.
- [20] A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, *92*, 411–415.
- [21] F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 5250–5251.
- [22] D. Neuhaus, M. P. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, 2nd ed., Wiley, New York, **2000**.
- [23] C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673–5685.
- [24] G. Kummerlöwe, B. Luy, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2009**, *68*, 193–230.
- [25] R. R. Gil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7222–7224; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7360–7362.
- [26] B. Böttcher, C. M. Thiele, *Determining the Stereochemistry of Molecules from Residual Dipolar Couplings in eMagRes*, Wiley, New York, **2012**.
- [27] See the Supporting Information.
- [28] L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **2012**, *45*, 849–854.
- [29] CCDC-1029699 contains the supplementary crystallographic information for this paper. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif.
- [30] S. Delbaere, J. Berthet, T. Shiozawa, Y. Yokoyama, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1853–1859.
- [31] J. Massaad, J. C. Micheau, C. Coudret, R. Sanchez, G. Guirado, S. Delbaere, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 6568–6575.
- [32] Averaged over both ring-flipped conformers.
- [33] Deviation to the average ΔG value. Only the a-p (M^*, S^*, S^*) conformer shows a higher $\Delta G(B, B')$ value of 1.9 kJ mol⁻¹.
- [34] E. E. Burnell, C. A. De Lange, *NMR of Ordered Liquids*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **2003**.
- [35] P. Lesot, C. Aroulanda, Z. Luz, *J. Chem. Phys.* **2009**, 131.
- [36] C. P. Butts, C. R. Jones, J. N. Harvey, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1193–1195.
- [37] C. R. Jones, C. P. Butts, J. N. Harvey, *Beilstein J. Org. Chem.* **2011**, *7*, 145–150.
- [38] C. P. Butts, C. R. Jones, E. C. Towers, J. L. Flynn, L. Appleby, N. J. Barron, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 177–184.
- [39] M. G. Chini, C. R. Jones, A. Zampella, M. V. D'Auria, B. Renga, S. Fiorucci, C. P. Butts, G. Bifulco, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 1489–1496.
- [40] J. Stonehouse, P. Adell, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6037–6038.
- [41] K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T. L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4199–4200.
- [42] K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, *125*, 302–324.
- [43] M. J. Thrippleton, J. Keeler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3938–3941; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 4068–4071.
- [44] K. E. Cano, M. J. Thrippleton, J. Keeler, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **2004**, *167*, 291–297.
- [45] M. J. Thrippleton, R. A. E. Edden, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2005**, *174*, 97–109.
- [46] S. Macura, B. T. Farmer, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* **1986**, *70*, 493–499.
- [47] H. T. Hu, K. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson.* **2006**, *182*, 173–177.
- [48] J. Tropp, *J. Chem. Phys.* **1980**, *72*, 6035–6043.
- [49] A. Kolmer, L. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, unpublished results.
- [50] A. Saupe, G. Englert, *Phys. Rev. Lett.* **1963**, *11*, 462.
- [51] J. A. Losonczi, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, *138*, 334–342.
- [52] J. L. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. P. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5008–5017.
- [53] C. M. Thiele, A. Marx, R. Berger, J. Fischer, M. Biel, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4455–4460; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4566–4571.
- [54] R. R. Gil, C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 840–848.
- [55] U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6900–6903.
- [56] P. Trigo-Mouriño, A. Navarro-Vázquez, J. F. Ying, R. R. Gil, A. Bax, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7576–7580; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7718–7722.
- [57] V. Schmidts, M. Fredersdorf, T. Lübken, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, C. M. Thiele, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 839–844.
- [58] V. Schmidts, PhD thesis, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt, (Germany), **2013**.
- [59] C. M. Thiele, V. Schmidts, B. Böttcher, I. Louzao, R. Berger, A. Maliniak, B. Stevansson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6708–6712; *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6836–6840.
- [60] H. Sun, U. M. Reinscheid, E. L. Whitson, E. J. d'Auvergne, C. M. Ireland, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14629–14636.
- [61] E. E. Burnell, C. A. De Lange, *J. Magn. Reson.* **1980**, *39*, 461–480.
- [62] E. E. Burnell, C. A. De Lange, O. G. Mouritsen, *J. Magn. Reson.* **1982**, *50*, 188–196.
- [63] A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O. F. Lange, T. F. Molinski, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15114–15115.
- [64] A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2008**, *192*, 314–322.
- [65] M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 1329–1331; *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 1341–1342.
- [66] D. Uhrin, G. Batta, V. J. Hruby, P. N. Barlow, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **1998**, *130*, 155–161.

- [67] B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, *118*, 282–285.
- [68] C. M. Thiele, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, *45*, 889–894.
- [69] M. Sarfati, P. Lesot, D. Merlet, J. Courtieu, *Chem. Commun.* **2000**, 2069–2081.
- [70] L. Verdier, P. Sakhaei, M. Zweckstetter, C. Griesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, *163*, 353–359.
- [71] T. Montag, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 2271–2274.
- [72] N. C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8334–8338; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8459–8463.
- [73] R. Berger, C. Fischer, M. Klessinger, *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 7157–7167.
- [74] G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 6836–6837.

Received: May 11, 2015

Published online on August 21, 2015

5. Zusammenfassung

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, neue weiterführende Erkenntnisse in der RDC-Untersuchung von flexiblen Molekülen zu erhalten. Es sollte an drei Beispielen evaluiert werden, wie sich zusätzlich eingebrachten RDC-restraints im Vergleich zu den NOE-/ ROE-restraints bei Konfigurations- vor allem aber auch bei Konformationsanalysen bewähren. Nacheinander werden hier jetzt die einzelnen Projekte kurz aufgelistet und die Vorteile herausgestellt. Anschließend folgt eine generelle Betrachtung der durchgeführten Analysen.

Diacetylhygrophorone A¹²

Mit Hilfe der experimentell bestimmten acht RDCs konnte die relative Konfiguration und Konformation des aus *H. persooniae* isolierten Naturstoffderivats Diacetylhygrophorone A¹² zweifelsfrei bestimmt werden. Die in der Literatur vorgeschlagene *trans*-Konfiguration der Substituenten an C4 und C5 im Cyclohexanon-Ring konnte bestätigt werden. Zusätzlich wurde auch das dritte bis dato unbestimmte Stereozentrum an C6 relativ zu den beiden anderen bestimmt. Aufgrund der sehr guten Anpassung der experimentell ermittelten und der berechneten RDCs mit einem RMSD von 0.4 Hz, kann die relative Konfiguration des Moleküls auf *4R5S6R* (bzw. *4S5R6S*) festgelegt werden.

Dithienylcyclopenten

Bei der Analyse eines photoschaltbaren Dithienylcyclopenten-Derivates konnten erstmals bei einem kleinen Molekül zwei ¹J_{C-C}-T-Kopplungen aus einem 1.1-ADEQUATE-Spektrum extrahiert und zusammen mit den zusätzlich bestimmten ¹T_{C-H}- und ¹³T_{C-H}-Kopplungen bei der Konformationsanalyse verwendet werden. Mit den insgesamt 8 erhaltenen RDC-Werten konnte das helikal-vororientierte antiparallele Konformer ermittelt werden, siehe dazu auch Scheme 3 in der angefügten Veröffentlichung. Dieses Resultat konnte in einem zweiten Alignment-Medium bestätigt werden und ist auch im Einklang mit den Ergebnissen aus der Röntgenstrukturanalyse. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die a-p Konformation zu mindestens 50% populiert ist. Eine präzisere Aussage bezüglich der Konformerpopulation aufgrund der alleinigen Nutzung der RDC-Daten war nicht möglich, da sich der per se schon sehr gute Qualitätsfaktor im Bereich von 50% bis 100% der a-p-Population nicht mehr änderte. Erst wenn a-p kleiner als 50% wurde, verschlechterte sich der Q-Faktor deutlich. Durch die Kombination von Distanz- und Energierechnungen konnte aber letztendlich eine gute Abschätzung abgegeben werden, dass die a-p-Konformation zu 92% und die p-Konformation entsprechend zu 8% in dem Ensemble vertreten ist.

Methylgriselimycin

Bisher wurden nur wenige RDC-Konformationsanalysen bei zyklischen Wirkstoffpeptiden durchgeführt. Bei den wenigen literaturbekannten Beispielen wurden meist bereits bekannte und gut untersuchte Peptide verwendet.^{169,172,173} In unserem Beispiel wurde die konformelle Flexibilität eines wiederentdeckten tuberkulotisch wirksamen zyklischen Depsipeptids (MGM) mit einer RDC-Analyse untersucht. Dabei konnten mehrere niederenergetische Strukturen mit ROE- und RDC-restraints aus dem Peptidrückgrat berechnet werden, die gut im Einklang mit den experimentellen Werten sind, siehe Abbildung 42 und Abbildung 43. Die ermittelten Strukturen konnten mit der Software RDC@hotFCHT bestätigt werden. Bei der zusätzlichen Verwendung der RDC-restraints aus den Seitenketten beider Proline konnte auch deren Ringkonformation bestimmt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich der zyklische Teil des MGM-Derivates gut mit einer Struktur darstellen lässt, siehe auch Abbildung 46. Der Vergleich mit den Strukturen welche nur mit ROE-restraints erzeugt wurden (420a, RMSD-Rückgrat 0,06 bis 0,6 Å) zeigt, dass die Einbringung von RDC-Kopplungen (420b, RMSD-Rückgrat < 0.2 Å) auch einen wertvollen Beitrag in der

Strukturverfeinerung von Peptiden leistet, siehe dazu Abbildung 49 B. Um ein vollständiges Bild der MGM-Konformation(en) zu erhalten, müsste in einer weiterführenden ROE/ RDC-Analyse noch die Flexibilität der Seitenkette untersucht werden.

Abschließend seien noch einige generelle Aspekte aus dieser Arbeit erwähnt. Die Fragenstellungen bezüglich der relativen Konfiguration von Diacetylhygrophorone A¹² mit nur einer vorliegenden Hauptkonformation konnten mit der durchgeführten RDC-Analyse beantwortet werden. Die Voraussetzung hierfür waren die bestimmten weitbereichs-RDC-Kopplungen aus den HETLOC-Spektren, die ähnlich präzise wie die über eine Bindung reichenden ¹H-¹³C-RDCs bestimmt werden konnten, obwohl sie etwa eine Größenordnung geringer sind. Zwar wurden auch noch weitere NMR-Experimente durchgeführt, jedoch konnten aus den anisotropen-NMR-Spektren aufgrund der schwachen oder nicht vorhandenen Signalintensitäten keine weiteren Kopplungen ermittelt werden. Dies kann mehrere Gründe haben. Zum einen sei auf die geringe Substanzmenge hingewiesen. Eine Ausstattung wie in Abbildung 28 beschrieben mit speziell angepasstem Ausrichtungs-Gel, 1.7 mm NMR-Röhrchen und die passende Geräteausstattung stand hier leider nicht zur Verfügung. Des Weiteren sind die meisten NMR-Experimente zur Ermittlung von Weitbereichskopplungen unempfindlicher als die in F1- oder F2-gekoppelten HSQC-Experimente. Da vor allem bei kleinen Molekülen nicht genügend ¹H-¹³C-RDCs bestimmt werden können, ist man aber meist auf diese eher unempfindlichen NMR-Experimente angewiesen. In solchen Fällen ist vorab eine sorgsame Planung der Probenpräparation (Alignmentmedium (siehe auch Kapitel 4.3 Dithienylcyclopenten-Dibromverbindung!), NMR-Röhrchen-Typ, Lösungsmittel), der Experimentenauswahl, vor allem aber auch der Geräteausstattung ratsam.

Bei Molekülen, die in mehreren Konformationen vorliegen, ist genügend Substanzmaterial aber auch nicht immer eine Garantie, für den erfolgreichen Abschluss. Bei dem DTC-Derivat lag ausreichend Substanzmaterial vor und so konnten neben ¹H-¹³C-RDCs- auch eine weitbereichs-RDC-Kopplung und zwei ¹³C-¹³C-RDCs-Kopplungen bestimmt werden. Mit diesen Messwerten konnte zwar das helikal-vororientierte Konformer eindeutig identifiziert werden, jedoch reichten die RDC-Daten alleine nicht aus, um das vorliegende Gesamtensemble genau zu bestimmen. Hier mussten zusätzliche Komplementärtechniken verwendet werden um eine eindeutige Aussage treffen zu können. Auch bei der Konformationsanalyse von dem zyklischen Peptid reichten die verwendeten RDC-Werte alleine nicht aus, um geeignete und chemisch sinnvolle Strukturen zu generieren. Erst mit der zusätzlichen Verwendung der ROE-restraints konnten geeignete Strukturen berechnet werden.

Generell gesagt ist es bei mittelgroßen Molekülen mit vielen Freiheitsgraden nicht ratsam, die Strukturgenerierung für die RDC-Analyse ohne die RDC bzw. NOE-/ ROE-restraints durchzuführen. Dieser „Versuch-und-Irrtum“-Ansatz wie er meist erfolgreich bei kleinen organischen Molekülen durchgeführt wird, ist zeitaufwändig und war zumindest hier bei diesem Beispiel nicht zielführend. Aufgrund der Empfindlichkeit der RDCs bezüglich Richtungsänderungen konnte mit diesen Methoden keine Struktur gefunden werden, welche auch nur annähernd zu den experimentellen RDC-Daten passte. Die Berücksichtigung der RDC-restraints bereits bei der Molekülsimulation führte hier zum Erfolg. Die Schwierigkeit bei mittelgroßen Molekülen bestand in diesem Fall daher darin, ein passendes Strukturmodell zu generieren. Ist dies gefunden, so kann hier abschließend konstatiert werden, dass die RDC-Methode als komplementäre Technik zur ROE-Methode einen wertvollen Beitrag bei der strukturellen Erforschung von neuen Wirkstoffmolekülen leisten kann.

6. Ergänzende Daten

6.1. Messdaten und Parameter aus dem Methylgriselimycinprojekt

Die in Tabelle 9 gezeigten Messwerte wurden im Rahmen der Masterthesis von LANNES²⁸ an einem Bruker Avance II 700MHz- US- Spektrometer aufgenommen, welches mit einem TXI 700S4 Kryoprobekopf ausgestattet ist. Dazu wurden folgende NMR-Experimente verwendet: ¹H, ¹³C, ¹H-¹H-COSY, ¹H-¹³C-HSQC, ¹H-¹³C-HMBC, ¹H-¹H-ROESY (Mischzeit = 150 ms) und ¹H-¹H-TOCSY. Alle Experimente wurden bei 300K in CDCl₃ durchgeführt.

Tabelle 9: Distanzabstände zwischen den Atomen 1 und 2 in Ångström [Å], welche für die MD-Simulation und anschließende Energieminimierung in 4.3.1 verwendet wurden. Exp-Dist entsprechen dabei den experimentellen Abständen, Lower sind die bei der Berechnung verwendeten unteren Grenzen (entspricht dem experimentellen Abstand minus 10%) bzw. Upper die oberen Grenzen (entspricht dem experimentellen Abstand plus 10% (plus Pseudoatomkorrektur). Av_Viol gibt den Fehler der experimentellen restraints der zehn energieminierten Strukturen wieder.

Atom 1	Atom 2	Exp-Dist	Lower	Upper	AV_Dist	AV_Viol
GLY10.H	LEU9.QNMe	3.55	3.19	4.9	3.32	0
GLY10.H	VAL7.QNMe	5.68	5.11	7.24	5.42	0
PRO5.HA	GLY10.H	5.64	5.08	6.21	5.03	0.05
VAL7.HA	GLY10.H	3.9	3.51	4.29	3.44	0.07
PRO8.HA	GLY10.H	4.52	4.07	4.97	4.11	0
LEU6.HA	GLY10.H	4.99	4.49	5.49	4.5	0
LEU9.HA	GLY10.H	2.68	2.42	2.95	2.7	0
LEU6.H	GLY10.H	3.67	3.3	4.03	2.89	0.41
LEU6.H	VAL7.QNMe	4.87	4.38	6.36	5.12	0
LEU4.HA	LEU6.H	5.13	4.61	5.64	4.94	0
PRO5.HA	LEU6.H	2.65	2.38	2.91	2.47	0
LEU6.H	VAL7.HA	5.21	4.69	5.73	4.72	0
LEU6.H	LEU6.HA	3.05	2.74	3.35	2.99	0
LEU6.H	LEU9.HA	5.64	5.08	6.2	4.6	0.48
LEU4.H	LEU6.H	4.91	4.42	5.4	5.09	0
LEU4.H	LEU4.HA	3.04	2.74	3.35	2.8	0
THR3.HA	LEU4.H	3.11	2.8	3.42	2.65	0.15
LEU4.H	PRO5.HA	5.59	5.03	6.15	5.68	0
THR3.HB	LEU4.H	2.1	1.89	2.31	2.38	0.07
THR3.HB	LEU4.HG	5.28	4.75	5.81	4.36	0.39
THR3.HB	THR.QNMe	3.87	3.48	5.26	4.43	0

THR3.HA	LEU4.HG	4.74	4.26	5.21	4.4	0
THR3.HA	LEU4.HA	4.19	3.77	4.61	4.16	0
THR3.HA	THR.QNMe	3.34	3.01	4.67	3.87	0
LEU9.HA	LEU6.QB	2.58	2.32	3.74	2.55	0
LEU9.HA	LEU9.QNMe	3.4	3.06	4.74	3.84	0
LEU9.HA	VAL7.QNMe	4.55	4.1	6.01	5.45	0
VAL7.HA	LEU9.HA	3.95	3.56	4.35	4.69	0.34
VAL1.HA	VAL1.QNMe	3.65	3.29	5.02	2.92	0.37
VAL1.HA	PRO2.HD1	2.45	2.2	2.69	2.99	0.3
VAL1.HA	PRO2.HD2	2.27	2.04	2.5	2.32	0
LEU6.HA	VAL7.QNMe	2.11	1.9	3.32	2.64	0
LEU6.HA	VAL7.HA	4.49	4.04	4.94	4.59	0
PRO2.HA	THR3.QG2	4	3.6	5.4	4.51	0
PRO2.HA	VAL1.QNMe	4.1	3.69	5.52	5.99	0.47
PRO2.HA	THR.QNMe	2.15	1.94	3.37	2.81	0
PRO2.HA	THR3.HA	4.29	3.86	4.72	4.62	0
PRO8.HA	LEU9.QNMe	2.27	2.04	3.49	2.78	0
PRO8.HA	VAL7.QNMe	4.57	4.11	6.03	5.48	0
VAL7.HA	LEU9.QNMe	3.53	3.18	4.89	4.12	0
VAL7.HA	VAL7.QNMe	3.4	3.06	4.74	3.86	0
PRO5.HA	VAL7.QNMe	4.84	4.36	6.32	6.73	0.41
PRO8.HA	VAL7.QG1	2.98	2.69	4.28	4.06	0
PRO8.HA	VAL7.QG2	4.36	3.92	5.8	5.31	0
VAL7.HA	VAL7.QG1	2.76	2.49	4.04	2.97	0
VAL7.HA	VAL7.QG2	2.82	2.54	4.11	3.11	0
PRO5.HA	VAL7.QG2	4.46	4.01	5.9	4.92	0
LEU6.HA	VAL7.QG2	4.22	3.8	5.64	4.27	0
LEU6.H	VAL7.QG2	5.15	4.64	6.67	4.5	0.14
PRO5.HG2	VAL7.QG2	5.19	4.67	6.71	7.11	0.4
PRO2.HG2	THR3.HA	4.64	4.18	5.11	4.45	0
THR3.QG2	THR.QNMe	2.97	2.68	5.27	4.07	0
LEU6.H	GLY10.HA1	3.27	2.95	3.6	2.69	0.26

LEU6.H	GLY10.HA2	3.98	3.58	4.38	4.33	0
LEU4.H	GLY10.HA1	4.34	3.9	4.77	4.81	0.04
LEU4.H	GLY10.HA2	4.8	4.32	5.28	5.45	0.17
THR3.HB	GLY10.HA2	4.2	3.78	4.62	4.43	0
THR3.HB	GLY10.HA1	4.25	3.82	4.67	4.61	0
PRO5.HA	GLY10.HA1	3.76	3.38	4.13	3.8	0
LEU4.HA	PRO5.QC78	5.64	5.08	7.21	5.28	0
GLY10.HA2	THR3.QG2	4.1	3.69	5.51	4.9	0
GLY10.HA1	THR3.QG2	4.57	4.11	6.02	5.64	0
GLY10.HA2	THR.QNMe	3.49	3.14	4.84	3.79	0
GLY10.HA1	THR.QNMe	3.38	3.04	4.72	3.65	0
PRO5.HG2	LEU6.H	5.58	5.03	6.14	4.79	0.24
PRO5.HD2	LEU6.H	4.98	4.48	5.48	4.97	0
PRO5.HD1	LEU6.H	4.92	4.43	5.41	5.15	0
VAL1.HA	VAL1.ACQMe	4.24	3.82	5.67	4.99	0
VAL7.HA	PRO8.HD1	4.36	3.92	4.8	4.54	0
LEU4.HA	PRO5.HB1	4.79	4.31	5.27	4.78	0
LEU4.HA	PRO5.HD1	2.26	2.04	2.49	2.47	0
LEU4.HA	PRO5.HD2	2.39	2.15	2.63	2.49	0
PRO2.HD2	VAL1.QG1	3.23	2.9	4.55	4.84	0.29
PRO2.HD2	VAL1.QG2	5.34	4.81	6.88	5.36	0
PRO2.HD2	THR3.QG2	6.05	5.44	7.65	6.65	0
VAL1.HB	PRO2.HD2	5.02	4.52	5.52	5.05	0
PRO2.HD2	VAL1.QNMe	4.7	4.23	6.17	3.69	0.54
PRO2.HD2	THR.QNMe	4.62	4.16	6.08	6.32	0.23
PRO2.HD2	THR3.HA	5.52	4.97	6.07	5.6	0
PRO2.HD1	VAL1.QG1	5.3	4.77	6.83	5.68	0
PRO2.HD1	VAL1.ACQMe	4.08	3.67	5.49	4.29	0
PRO8.HD2	VAL7.QG1	5.39	4.85	6.93	5.62	0
PRO8.HD2	LEU9.QNMe	4.92	4.43	6.42	6.41	0
PRO8.HD2	VAL7.QNMe	4.03	3.62	5.43	4.53	0
VAL7.HA	PRO8.HD2	4.55	4.09	5	4.66	0

PRO8.HD2	LEU9.HA	5.78	5.2	6.36	6.05	0
PRO8.HD1	VAL7.QG1	3.95	3.55	5.34	4.87	0
LEU4.H	LEU4.HG	3.05	2.75	3.36	2.38	0.37
PRO5.HD2	LEU4.QD2	3.26	2.93	4.59	3.62	0
PRO5.HD2	LEU4.QD1	4.37	3.94	5.81	5.07	0
LEU4.HB1	PRO5.HD2	2.49	2.25	2.74	2.4	0
LEU4.HG	PRO5.HD2	4.55	4.09	5	4.75	0
VAL7.QG2	VAL7.QNMe	3.11	2.8	5.42	4.25	0
VAL7.HB	VAL7.QNMe	2.52	2.27	3.77	3.13	0
PRO2.HB2	THR.QNMe	2.97	2.68	4.27	3.27	0
PRO2.HB1	THR.QNMe	3.41	3.07	4.75	4.1	0
VAL1.QNMe	VAL1.ACQMe	2.55	2.29	4.8	3.28	0
PRO5.HB2	VAL7.QG2	5.1	4.59	6.61	5.48	0
PRO8.HG2	LEU9.HG	3.7	3.33	4.07	2.88	0.45
VAL1.HB	THR3.QG2	4.21	3.79	5.63	5.77	0.14
VAL1.HB	PRO2.HA	5.03	4.53	5.54	4.94	0
VAL1.QG2	VAL1.ACQMe	3.99	3.59	6.39	5.01	0
LEU9.HG	LEU9.QNMe	3.96	3.56	5.35	3.78	0
VAL1.QNMe	PRO2.QGMe	4.73	4.26	7.2	5.63	0
THR.QNMe	PRO2.QGMe	4.83	4.34	7.31	6.46	0
LEU9.QNMe	PRO8.QGMe	5.18	4.66	7.7	6.38	0
VAL1.QG1	VAL1.QNMe	5	4.5	7.5	5.42	0
VAL7.QG1	LEU9.QNMe	4.87	4.39	7.36	6.37	0
VAL7.QG1	VAL7.QNMe	4.13	3.72	6.55	5.3	0
VAL1.QG2	VAL1.QNMe	3.09	2.78	5.4	3.6	0
GLY10.H	VAL7.QG2	6.13	5.51	7.74	5.05	0.46
LEU6.H	LEU6.HG	3.47	3.12	3.81	2.93	0.19
PRO5.HB2	LEU6.H	5.53	4.97	6.08	4.5	0.47
LEU4.H	THR.QNMe	4.15	3.73	5.56	5.09	0
THR3.HB	LEU4.QD2	4.5	4.05	5.95	6.47	0.52
THR3.HB	VAL1.QG1	6.26	5.63	7.88	7.08	0
THR3.HB	LEU4.HB1	5.28	4.75	5.81	5.9	0.09

THR3.HA	THR3.HB	2.34	2.11	2.57	2.42	0
THR3.HA	VAL1.QG1	4.65	4.18	6.11	6.05	0
THR3.HA	THR3.QG2	2.7	2.43	3.97	3.02	0
PRO2.HB2	THR3.HA	4.36	3.92	4.8	4.64	0
VAL1.HA	VAL1.QG1	2.82	2.54	4.1	2.92	0
VAL1.HA	VAL1.QG2	2.92	2.63	4.22	3.11	0
PRO5.HB2	LEU6.HA	5.48	4.94	6.03	4.86	0.08
PRO2.HA	VAL1.QG1	4.82	4.34	6.3	5.72	0
LEU4.HA	LEU4.QD1	3.34	3.01	4.68	4.68	0
LEU4.HA	LEU4.QD2	2.63	2.37	3.89	2.95	0
LEU4.HA	LEU4.HG	3.21	2.89	3.53	3.16	0
PRO8.HD2	LEU9.QQD	5.08	4.57	7.79	6.44	0
LEU4.H	PRO5.HD2	5.79	5.21	6.37	4.96	0.25
VAL1.HB	VAL1.QNMe	2.68	2.41	3.95	4.4	0.45
LEU4.HB1	PRO5.HG2	4.41	3.97	4.85	4.03	0
LEU9.HG	PRO8.QB	3.39	3.05	4.63	3.32	0
VAL7.HA	PRO8.QB	4.05	3.64	5.35	4.57	0
PRO5.HG2	LEU6.QB	5.17	4.66	6.59	6.37	0
VAL7.HA	LEU6.QB	4.41	3.97	5.75	4.63	0
VAL7.QNMe	LEU6.QB	3.32	2.99	5.56	3.91	0
LEU4.HB2	THR.QNMe	4.86	4.38	6.35	6.8	0.45
LEU6.HG	VAL7.QNMe	4.36	3.92	5.79	5.49	0
LEU6.HG	LEU9.HA	4.33	3.9	4.77	4.8	0.03
VAL1.QG1	THR3.QG2	3.67	3.31	6.04	5.14	0
GLY10.HA1	GLY10.H	2.53	2.28	2.79	2.34	0
GLY10.HA2	GLY10.H	2.86	2.58	3.15	2.72	0
GLY10.HA1	LEU9.QNMe	3.94	3.55	5.34	4.87	0
GLY10.HA2	LEU9.QNMe	3.55	3.19	4.9	3.89	0
GLY10.HA1	VAL7.QNMe	5.1	4.59	6.61	7.05	0.44

Tabelle 10: Torsionswinkel ϕ , ψ , ω der 10 generierten ROE/MD (SYBYL)-Strukturen (zyklischer Teil). Zusätzlich sind im unteren Teil der Tabelle die entsprechenden Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Winkel angezeigt.

Konf.		Leu4			Pro5			Leu6			Val7		
	ϕ	ψ	ω	ϕ	ψ	ω	ϕ	ψ	ω	ϕ	ψ	ω	ϕ
10	-55	147.8	-177.7	-72.2	80	-179.3	-123.8	146	-172.8	-141.3	94.8	10.3	-76.2
35	-58.6	148.8	-178.3	-72.7	80	-179.1	-126.8	147	-172.5	-143.9	93.2	10.1	-74.9
40	-56.3	150.4	-179	-71.1	81.6	-179.5	-126	146.4	-171.6	-144.1	92.7	9.4	-74.4
50	-55.9	151.4	-179.3	-70.7	81.7	-180	-124.7	146	-171.3	-144	93.1	9.1	-74.6
60	-57.7	150.4	-178.9	-71.2	81.3	-179.7	-124.2	146.3	-172.1	-142.7	93.9	9.5	-75.3
65	-58.2	150.2	-178.7	-71	81.5	-179.8	-123.1	146.2	-172.3	-142.2	94.3	9.6	-75.7
70	-56.8	151.5	-179.3	-71	81.7	-179.8	-125.1	146.2	-171.6	-143.9	93.4	9.06	-74.6
80	-56.7	147.6	-178	-72.9	80	-178.6	-127.3	147.1	-172.6	-143.4	92.9	10.6	-75.2
90	-56.1	147.3	-177.8	-72.8	79.9	-178.6	-127.5	147	-172.5	-143.4	92.7	10.8	-75.1
95	-58.2	149.6	-178.3	-71.9	80.4	-180	-123	146.2	-172.7	-141.7	95.5	9.6	-76.1
MW	-57	149.7	-178.5	-71.8	80.8	-179.4	-125.2	146.4	-172.2	-143.06	93.7	9.81	-75.21
Stabw	1.18	1.51	0.59	0.85	0.81	0.53	1.68	0.43	0.53	1.02	0.95	0.61	0.63
Konf.		Pro8			Leu9			Gly10					
		ψ	ω	ϕ	ψ	ω	ϕ	ψ	ω	Gly10-O-Thr3-Verknüpfung			
10		170.7	173.4	134.6	-52	174.5	47.8	-138	-169.4	81.8	-63	-53	-176.4
35		170.9	174.8	133.5	-52	173.1	46.1	-141	-170.9	82.8	-68	-41	-179.1
40		170.8	174.2	134.7	-52	174.7	46.6	-138	-170.3	81.8	-64	-51	-176.9
50		170.7	174.1	135	-51	175.1	46.9	-135	-169.1	81.4	-64	-52	-176.5
60		170.7	173.6	134.9	-52	175.2	47.1	-136	-170.5	82.2	-63	-52	-176.6
65		170.6	173.4	135	-51	175.5	47.6	-136	-170.7	82.4	-63	-53	-176
70		170.7	174.1	134.9	-52	175.1	46.6	-135	-169.6	81.7	-65	-50	-177.1
80		170.8	174.4	133.9	-53	173.5	46.6	-142	-171.7	82.4	-64	-47	-178.5
90		170.8	174.5	133.9	-53	173.4	46.6	-143	-171.5	82.2	-64	-47	-178.4
95		170.7	173.6	134.3	-52	174.5	47.5	-136	-169.4	82.4	-66	-48	-178.3
MW		170.7	174.01	134.5	-52	174.46	46.94	-138	-170.3	82.11	-64	-49	-177.4
Stabw		0.08	0.49	0.54	0.69	0.84	0.55	2.84	0.91	0.42	1.61	3.84	1.09

Tabelle 11: Chemische Verschiebungen von Methylgriselimycin in CDCl₃ bei 300 K. Die chemischen Verschiebungen sind auf Tetramethylsilan (TMS) referenziert.

Aminosäure	Atombezeichnung	Proton (¹ H)	Kohlenstoff (¹³ C)
Valin 1 (Val1)	Carbonyl-C-Acetyl		
	Acetyl-Methyl	2.11	22.17
	N-Methyl	3.03	31.48
	α	5.06	58.83
	β	2.23	27.71
Val1.QG1 Pro-R	γ	0.98	18.81
Val1.QG2 Pro-S	γ'	0.84	18.87
	Carbonyl-C		169.35
Prolin 2 (MePro2)	α	4.92	56.43
Pro2.HB2 Pro-R	β	2.08	36.44
Pro2.HB1 Pro-S	β'	1.77	36.44
	γ	2.61	32.20
	γ-Methyl	1.00	17.59
Pro2.HD2 Pro-S	δ	3.95	54.38
Pro2.HD1 Pro-R	δ'	3.35	54.38
	Carbonyl-C		173.39
Threonin 3 (Thr3)	N-Methyl	3.10	34.12
	α	5.60	59.96
	β	5.92	69.12
	γ-Methyl	1.34	17.79
	Carbonyl-C		168.95
Leucin 4 (Leu4)	NH	6.50	117.39
	α	4.35	50.99
Leu4.HB2 Pro-R	β	1.49	40.04
Leu4.HB1 Pro-S	β'	1.25	40.04
	γ	1.75	25.20

Leu4.CD1 Pro-R	δ	0.95	23.41
Leu4.CD2 Pro-S	δ'	0.92	20.77
	Carbonyl-C		
Prolin 5 (MePro5)	α	4.58	60.27
Pro5.HB2 Pro-R	β	2.56	33.11
Pro5.HB1 Pro-S	β'	1.40	33.11
	γ	2.43	33.62
	γ -Methyl	1.08	16.70
Pro5.HD2 Pro-S	δ	3.49	53.32
Pro5.HD1 Pro-R	δ'	3.09	53.32
	Carbonyl-C		170.55
Leucin 6 (Leu6)	NH	7.83	122.93
	α	4.97	46.46
	β	1.51	41.44
	β'		
	γ		
	δ		
	δ'	0.91	23.54
	Carbonyl-C		174.62
Valin 7 (Val7)	N-Methyl	3.28	30.68
	α	4.73	57.30
	β	2.25	28.30
Val7.QG1 Pro-R	γ	0.88	18.97
Val7.QG2 Pro-S	γ'	0.74	18.33
	Carbonyl-C		168.64
Prolin 8 (MePro8)	α	4.76	58.84
	β		
	β'		
	γ	2.26	29.66

	γ -Methyl	1.05	17.52
Pro8.HD2 Pro-S	δ	3.84	53.75
Pro8.HD1 Pro-R	δ'	3.13	53.75
	Carbonyl-C		169.90
Leucin 9 (Leu9)	N-Methyl	2.85	30.57
	α	5.08	55.32
	β	1.25	37.02
	β'	1.90	37.02
	γ	1.47	24.73
	δ	0.92	22.74
	δ'	0.92	22.78
	Carbonyl-C		171.18
Glycin 10 (Gly10)	NH	8.82	106.61
Gly10.HA1 Pro-S	α	4.20	42.75
Gly10.HA2 Pro-R	α'	4.04	42.75
	Carbonyl-C		170.59

Tabelle 12: Gesamtheit aller bestimmten RDCs von MGM in PDMS-Gel in CDCl_3 ($D(\text{eff})$). Kopplungen die aufgrund von Signalüberlagerungen oder auch nicht zugeordnet werden konnten sind mit einem n.d. (not determined) gekennzeichnet. Die RDCs der N-Methylgruppen bzw. C-Methylgruppen wurden in die entsprechenden internuklearen N-C bzw. CC-Vektoren umgerechnet. Alle Kopplungen sind in der Einheit Hz angegeben.

Residue		J-Coupling	Error - exp.	T-Coupling	Error - exp.	D (T-J)/2	D[CH ₃ * (-0.291)]	D[CH ₃ * (0.127)]	D(eff)
Val1	Carbonyl-C-Acetyl								
	Acetyl-Methyl	127.95	0.10	129.14	1.00	0.59	-0.17		-0.17
	N-Methyl	138.23	0.10	137.09	0.20	-0.57		-0.07	-0.07
	α	138.77	0.10	128.90	0.20	-4.94			-4.94
	β	128.87	0.50	112.74	1.00	-8.07			-8.07
Val1.QG1 Pro-R	γ	125.90	0.10	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
Val1.QG2 Pro-S	γ'	125.27	0.20	135.12	0.80	4.93	-1.43		-1.43
	Carbonyl-C								
Pro2	α	146.69	0.10	162.19	1.00	7.75			7.75
Pro2.HB 2 Pro-R	β	133.90	0.50	124.86	0.50	-4.52			-4.52
Pro2.HB 1 Pro-S	β'	131.57	0.30	162.15	1.00	15.29			15.29
	γ	132.67	0.30	157.35	1.00	12.34			12.34
	γ -Methyl	125.55	0.20	124.80	0.50	-0.38	0.11		0.11
Pro2.HD 2 Pro-S	δ	143.51	0.20	159.04	0.70	7.77			7.77
Pro2.HD 1 Pro-R	δ'	142.58	0.20	142.74	1.00	0.08			0.08
	Carbonyl-C								
Thr3	N-Methyl	138.80	0.10	133.29	0.60	-2.76		-0.35	-0.35
	α	131.25	0.10	134.09	0.60	1.42			1.42
	β	145.02	0.10	170.06	0.50	12.52			12.52
	γ -Methyl	128.74	0.20	132.85	0.50	2.05	-0.60		-0.60

	Carbonyl-C								
Leu4	NH	-88.86	0.40	-95.78	1.00	-3.46			-3.46
	α	142.69	0.10	139.96	0.80	-1.36			-1.36
Leu4.HB 2 Pro-R	β	127.89	0.30	186.47	1.00	29.29			29.29
Leu4.HB 1 Pro-S	β'	125.77	0.30	149.98	1.00	12.11			12.11
	γ	125.94	0.10	102.02	1.00	-11.96			-11.96
Leu4.CD1 Pro-R	δ	124.96	0.20	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
Leu4.CD2 Pro-S	δ'	124.52	0.20	125.80	0.50	0.64	-0.19		-0.19
	Carbonyl-C								
Pro5	α	143.28	0.10	159.61	0.50	8.17			8.17
Pro5.HB 2 Pro-R	β	137.21	0.50	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
Pro5.HB 1 Pro-S	β'	129.85	0.50	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	γ	129.04	0.50	103.36	1.00	-12.84			-12.84
	γ -Methyl	125.80	0.20	124.96	0.50	-0.42	0.12		0.12
Pro5.HD 2 Pro-S	δ	142.80	0.30	177.36	0.70	17.28			17.28
Pro5.HD 1 Pro-R	δ'	140.07	0.20	99.22	1.50	-20.43			-20.43
	Carbonyl-C								
Leu6	NH	-90.98	0.10	-72.66	1.00	9.16			9.16
	α	140.41	0.10	123.37	0.20	-8.52			-8.52
	β	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	β'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	γ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	δ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.

	δ'	124.96	0.20						
	Carbonyl-C								
Val7	N-Methyl	139.51	0.10	144.35	1.00	2.42		0.31	0.31
	α	137.62	0.10	108.46	0.20	-14.58			-14.58
	β	129.65	0.50	94.75	2.00	-17.45			-17.45
Val7.QG1 Pro-R	γ	125.38	0.20	121.81	1.00	-1.79	0.52		0.52
Val7.QG2 Pro-S	γ'	125.48	0.20	132.61	0.80	3.57	-1.04		-1.04
	Carbonyl-C								
Pro8	α	143.59	0.10	160.15	0.30	8.28			8.28
	β	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	β'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	γ	130.44	0.30	156.08	0.60	12.82			12.82
	γ -Methyl	125.70	0.20	127.33	0.50	0.81	-0.24		-0.24
Pro8.HD 2 Pro-S	δ	145.28	0.30	162.46	0.80	8.59			8.59
Pro8.HD 1 Pro-R	δ'	141.35	0.50	140.11	0.80	-0.62			-0.62
	Carbonyl-C								
Leu9	N-Methyl	137.89	0.10	136.18	0.40	-0.85		-0.11	-0.11
	α	137.40	0.10	147.08	0.20	4.84			4.84
	β	125.94	0.10	105.33	1.00	-10.31			-10.31
	β'	127.75	0.30	127.05	1.00	-0.35			-0.35
	γ	125.92	0.30	101.97	1.00	-11.98			-11.98
	δ	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	δ'	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.			n.d.
	Carbonyl-C								

Gly10	NH	-94.98	0.10	-78.72	1.00	8.13			8.13
Gly10.HA 2 Pro-R	α	137.46	0.30	157.31	1.00	9.93			9.93
Gly10.HA 1 Pro-S	α'	141.76	0.30	149.85	0.70	4.05			4.05
	Carbonyl- C								

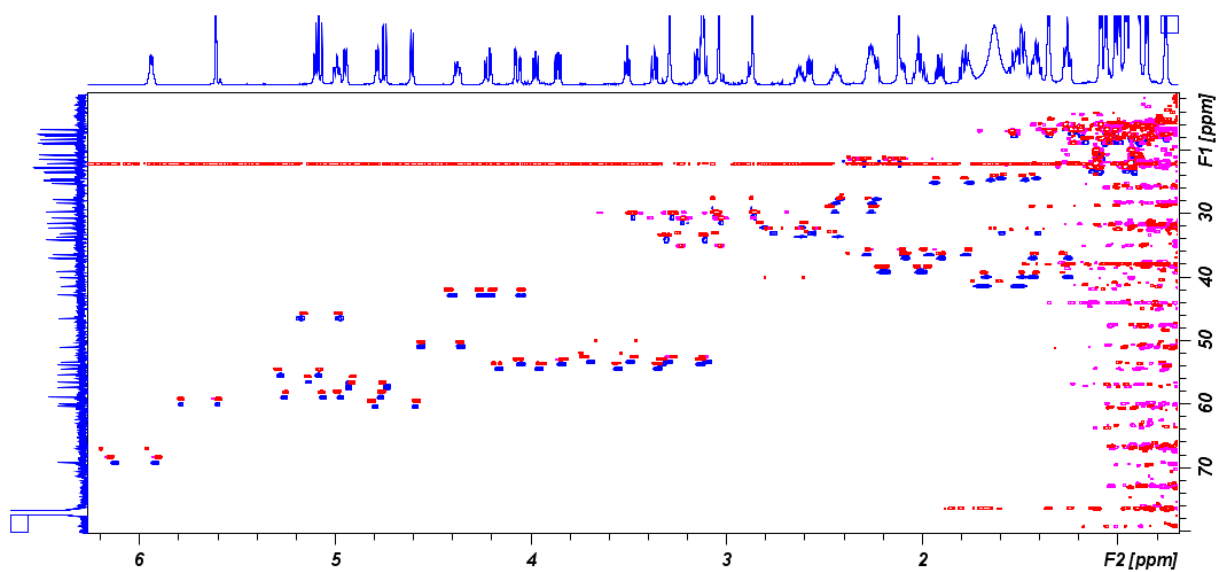


Abbildung 59: Überlagerte CLIP-HSQC-Spektren isotrop (blau)/ anisotrop (rot) in PDMS/ CDCl_3 (300K) zur Bestimmung der heteronuklearen $^1\text{J}_{\text{CH}}$ und $^1\text{T}_{\text{CH}}$ Kopplungen.

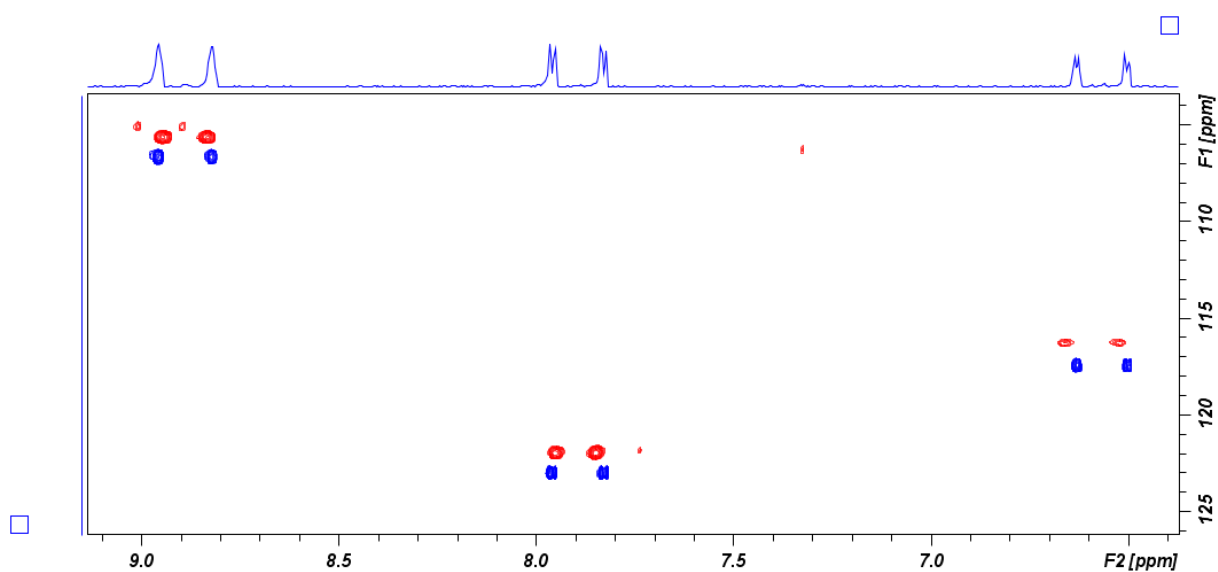


Abbildung 60: Überlagerte CLIP-HSQC-Spektren isotrop/ anisotrop in PDMS/ CDCl_3 (300K) zur Bestimmung der heteronuklearen $^1\text{J}_{\text{NH}}$ (schwarz) und $^1\text{T}_{\text{NH}}$ (rot) Kopplungen.

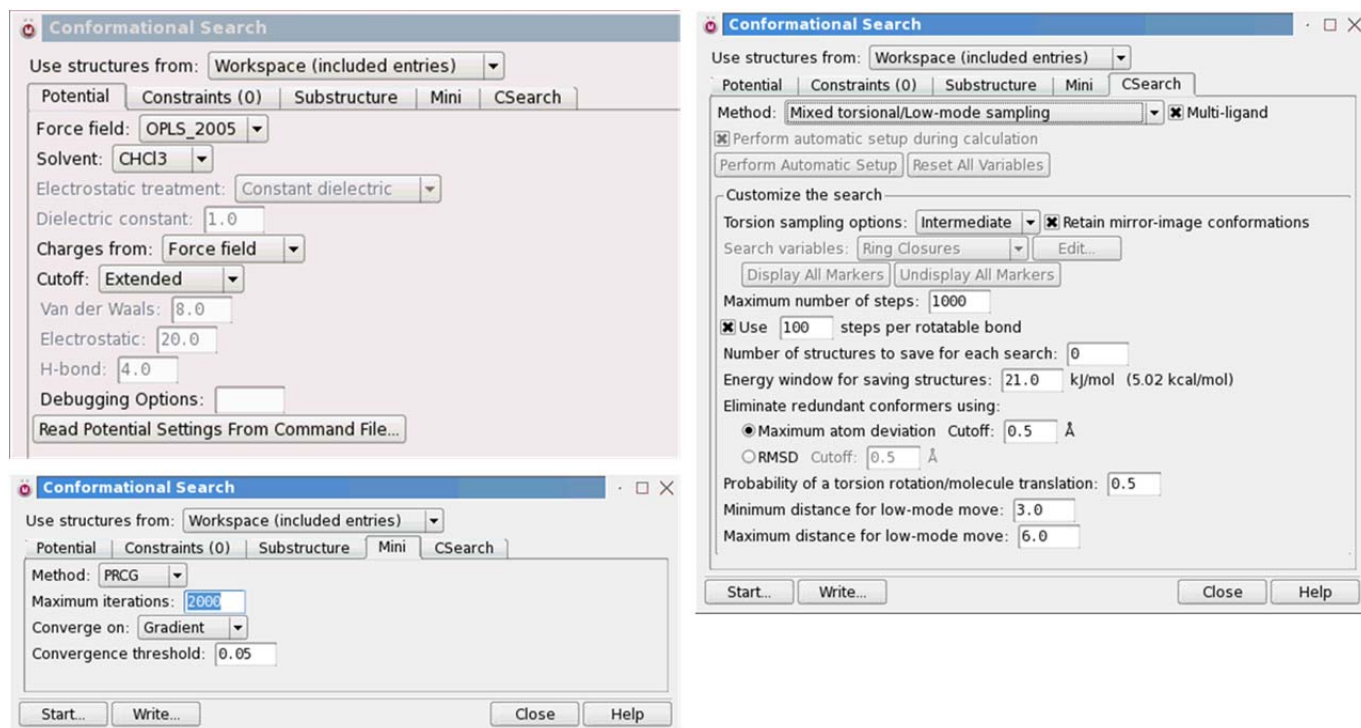


Abbildung 61: Einstellungsparameter des *conformational-search* Moduls der Software Maestro-Schrodinger-Suite 2012.⁸⁷ Diese wurden sowohl bei den Konformationsanalysen von DTC als auch von Methylgriselimycin verwendet.

Tabelle 13: Ergebnisse der MGM-Konformationsanalyse (Suchmethode Mixed-torsional/ Low-mode-sampling, Kraftfeld OPLS_2005) mit der Software Maestro-Schrödinger Version 9.3.5. Insgesamt wurde 165 Strukturen generiert.

Title	Pot. Energy [kJ/ mol]	Min. Converged	Times-Found	Rel. Pot. Energy [kJ/ mol]	RMSD [Å]
Conf1	377.265	true	10	0	
Conf127	392.724	true	10	15.459	0.0383
Conf131	393.39	true	4	16.125	0.0392
Conf161	396.986	true	5	19.721	0.0413
Conf21	381.727	true	4	4.462	0.0519
Conf16	380.822	true	8	3.557	0.0565
Conf18	381.263	true	3	3.998	0.0565
Conf61	386.889	true	9	9.624	0.058
Conf15	380.717	true	7	3.452	0.0582
Conf47	385.742	true	6	8.477	0.0608
Conf35	384.492	true	4	7.227	0.0664
Conf30	383.665	true	3	6.4	0.0666
Conf68	387.675	true	14	10.41	0.0678
Conf120	392.25	true	1	14.985	0.068
Conf65	387.227	true	4	9.962	0.0692
Conf20	381.345	true	1	4.08	0.0732
Conf125	392.54	true	5	15.275	0.0733
Conf69	387.799	true	5	10.534	0.0751
Conf57	386.504	true	1	9.239	0.0803
Conf49	385.896	true	2	8.631	0.0849
Conf53	386.148	true	3	8.883	0.088
Conf63	387.059	true	8	9.794	0.0883
Conf31	383.732	true	3	6.467	0.0892
Conf101	391.125	true	10	13.86	0.0907
Conf147	395.742	true	5	18.477	0.0917
Conf64	387.13	true	3	9.865	0.0927
Conf41	385.378	true	2	8.113	0.0928
Conf126	392.657	false	1	15.392	0.102
Conf50	385.953	true	10	8.688	0.1107

Conf94	390.584	true	10	13.319	0.1141
Conf52	386.115	true	9	8.85	0.1213
Conf108	391.539	true	6	14.274	0.1225
Conf149	395.865	true	8	18.6	0.1272
Conf114	391.858	true	6	14.593	0.131
Conf105	391.362	true	6	14.097	0.1313
Conf45	385.693	true	1	8.428	0.1318
Conf124	392.45	true	5	15.184	0.1319
Conf37	384.598	true	9	7.333	0.1325
Conf86	389.941	true	8	12.676	0.1344
Conf12	379.761	true	1	2.496	0.1351
Conf97	390.968	true	7	13.703	0.1367
Conf146	395.477	true	2	18.212	0.1375
Conf109	391.561	true	6	14.295	0.1377
Conf81	389.437	true	1	12.172	0.138
Conf14	380.713	true	8	3.448	0.1403
Conf32	383.744	true	5	6.479	0.142
Conf102	391.148	true	1	13.883	0.1427
Conf72	388.216	true	6	10.951	0.1468
Conf139	394.296	true	2	17.031	0.1487
Conf62	386.938	true	6	9.673	0.1488
Conf19	381.335	true	3	4.07	0.1501
Conf4	377.513	true	3	0.248	0.1527
Conf48	385.786	true	8	8.521	0.1538
Conf27	382.891	true	4	5.626	0.1543
Conf153	396.376	true	1	19.111	0.1578
Conf66	387.622	true	4	10.357	0.1617
Conf156	396.604	true	3	19.339	0.1732
Conf8	379.311	true	3	2.046	0.1753
Conf40	385.05	true	1	7.785	0.1863
Conf151	396.367	true	6	19.102	0.188

Conf38	384.631	true	9	7.366	0.1891
Conf24	382.372	true	6	5.107	0.1899
Conf92	390.339	true	14	13.074	0.1938
Conf56	386.496	true	2	9.231	0.1944
Conf164	397.917	true	1	20.652	0.199
Conf60	386.831	true	10	9.565	0.2037
Conf111	391.727	true	1	14.462	0.2045
Conf89	390.12	true	4	12.854	0.2047
Conf122	392.291	true	5	15.026	0.2085
Conf138	394.292	true	5	17.027	0.2148
Conf7	379.234	true	7	1.968	0.2238
Conf134	393.791	true	9	16.526	0.2255
Conf2	377.347	true	16	0.082	0.2263
Conf163	397.208	true	1	19.942	0.2269
Conf112	391.745	true	9	14.48	0.227
Conf107	391.521	false	1	14.256	0.2282
Conf154	396.533	true	13	19.267	0.2287
Conf118	392.221	true	3	14.956	0.2296
Conf155	396.566	true	7	19.301	0.2346
Conf90	390.207	true	6	12.942	0.2357
Conf76	388.815	true	7	11.55	0.2365
Conf148	395.854	true	4	18.589	0.2365
Conf34	384.485	true	12	7.22	0.2368
Conf44	385.662	true	8	8.397	0.237
Conf130	392.985	true	6	15.72	0.2386
Conf136	394.142	true	2	16.877	0.2399
Conf84	389.704	true	4	12.439	0.2422
Conf46	385.712	true	3	8.447	0.2434
Conf159	396.763	true	4	19.498	0.2449
Conf58	386.521	true	9	9.255	0.245
Conf82	389.55	true	6	12.285	0.2464

Conf83	389.675	true	14	12.41	0.2466
Conf132	393.438	true	5	16.173	0.2504
Conf55	386.189	true	4	8.924	0.2508
Conf73	388.543	true	12	11.278	0.2521
Conf78	388.995	true	4	11.73	0.2546
Conf17	381.004	true	1	3.739	0.255
Conf79	389.343	true	3	12.078	0.2578
Conf10	379.374	true	5	2.109	0.258
Conf70	387.936	true	2	10.671	0.2694
Conf96	390.837	true	3	13.571	0.2703
Conf142	394.542	true	2	17.277	0.2706
Conf165	398.122	true	9	20.857	0.2728
Conf87	390.06	true	13	12.795	0.2733
Conf85	389.754	true	4	12.488	0.2751
Conf144	395.174	true	5	17.909	0.281
Conf74	388.586	true	3	11.32	0.2811
Conf5	378.07	true	7	0.805	0.2814
Conf88	390.082	true	4	12.817	0.2822
Conf11	379.414	true	4	2.149	0.2823
Conf150	395.972	true	6	18.707	0.2828
Conf28	383.253	true	12	5.988	0.2835
Conf119	392.242	true	2	14.976	0.2838
Conf75	388.805	true	1	11.539	0.2845
Conf95	390.789	true	1	13.524	0.2848
Conf116	392.098	true	1	14.833	0.2883
Conf140	394.424	true	3	17.159	0.2883
Conf133	393.79	true	4	16.525	0.2914
Conf135	393.916	true	2	16.651	0.2925
Conf141	394.456	true	5	17.191	0.2948
Conf110	391.63	true	7	14.365	0.295
Conf129	392.916	true	1	15.65	0.2952

Conf43	385.593	true	4	8.328	0.296
Conf6	378.769	true	11	1.504	0.2968
Conf36	384.553	true	2	7.288	0.2979
Conf162	397.159	true	4	19.894	0.2992
Conf13	380.476	true	6	3.211	0.2997
Conf80	389.372	true	5	12.107	0.2998
Conf25	382.753	true	6	5.488	0.3012
Conf115	392.097	true	8	14.832	0.302
Conf145	395.373	true	3	18.108	0.3021
Conf99	390.988	true	5	13.723	0.3029
Conf91	390.223	true	2	12.958	0.3044
Conf59	386.64	true	6	9.375	0.3052
Conf9	379.312	true	2	2.047	0.3057
Conf54	386.156	true	10	8.89	0.3093
Conf67	387.665	true	5	10.4	0.3161
Conf128	392.752	true	4	15.487	0.3169
Conf22	381.774	true	2	4.509	0.3172
Conf23	382.17	true	3	4.905	0.3206
Conf42	385.523	true	6	8.258	0.321
Conf117	392.207	true	1	14.942	0.3251
Conf143	394.636	true	6	17.371	0.3267
Conf113	391.835	true	6	14.57	0.3271
Conf98	390.988	true	14	13.723	0.3297
Conf104	391.33	true	6	14.065	0.3317
Conf103	391.161	false	4	13.896	0.3331
Conf106	391.483	true	2	14.218	0.3356
Conf33	384.433	true	4	7.168	0.3381
Conf39	385.042	true	1	7.777	0.3582
Conf77	388.859	true	13	11.594	0.3615
Conf71	388.156	true	8	10.891	0.4451
Conf51	386.062	true	5	8.797	0.4509

Conf123	392.365	true	5	15.1	0.4823
Conf29	383.414	true	7	6.149	0.4946
Conf152	396.373	true	9	19.108	0.5059
Conf137	394.172	true	12	16.907	0.5106
Conf158	396.691	true	4	19.426	0.5167
Conf160	396.778	true	5	19.513	1.4049
Conf26	382.863	true	10	5.598	1.4301
Conf100	391.015	true	5	13.75	1.4501
Conf121	392.257	true	6	14.992	1.4592
Conf3	377.48	true	1	0.215	1.4793
Conf157	396.616	true	3	19.35	1.4962
Conf93	390.481	true	6	13.216	1.5039

Tabelle 14: Torsionswinkel φ , ψ , ω des zyklischen Peptidrückgrats ausgewählter Strukturen. Sie wurden mit der *conformational-search*-Methode mit Maestro-Schrödinger erzeugt.

	LEU4	LEU4	LEU4	PRO 5	PRO 5	PRO 5	LEU6	LEU6	LEU6		
Struktur	ψ	ω	φ	ψ	ω	φ	ψ	ω	φ		
Median (Ensemble)	158	-162	-37	7	166	-97	105	-170	-116		
86	157	-162	-37	6	165	-97	100	-167	-118		
165	142	-161	-35	10	166	-92	105	-170	-110		
94	160	-163	-37	7	165	-98	103	-170	-116		
73	159	-164	-37	7	165	-98	104	-170	-117		
92	140	177	-62	11	-173	-106	115	170	-124		
61	-178	175	-49	0	171	-109	101	-175	-120		
137	128	-157	-35	15	166	-89	108	-169	-114		
34	142	180	-60	1	-174	-97	121	165	-125		
52	158	-162	-35	6	163	-96	103	-168	-121		
1	160	-164	-36	6	162	-97	104	-167	-118		
48	154	-160	-37	8	170	-97	106	-173	-112		
16	159	-164	-36	7	165	-99	104	-169	-118		
73	159	-164	-37	7	165	-98	104	-170	-117		
127	129	-158	-34	18	164	-89	108	-170	-114		
Struktur	ψ	ω	φ	ψ	ω	φ	ψ	ω	φ	ψ	ω
Median (Ensemble)	124	-19	-70	172	168	122	-38	178	-87	-21	-175
86	128	-18	-68	174	171	119	-44	180	-85	-15	-175
165	134	-27	-75	175	173	111	-33	177	-81	-21	-175
94	125	-18	-71	174	169	118	-38	179	-86	-20	-176
73	124	-17	-71	174	168	118	-37	179	-87	-20	-176
92	126	-1	-55	154	-171	131	-100	-177	74	-171	-173
61	126	-15	-68	173	167	120	-43	179	-80	-26	-172
137	130	-21	-73	173	165	118	-36	179	-82	-21	-174
34	119	1	-56	155	-173	131	-99	-177	73	-173	-172



52	122	-17	-66	173	171	124	-41	-179	-89	-15	-175
1	123	-26	-62	173	173	124	-43	178	-92	-18	-177
48	127	-20	-74	169	165	121	-31	175	-92	-20	-174
16	126	-17	-69	173	169	121	-42	-180	-87	-20	-176
73	124	-17	-71	174	168	118	-37	179	-87	-20	-176
127	128	-21	-73	172	165	119	-35	179	-84	-21	-175

Tabelle 15: Übersicht über die von XPLOR-ausgegebenen Energietermine in kcal/mol (RUN317). Bei der Berechnung wurde der komplette ROE-Datensatz verwendet. Alle Energietermine sind in [kcal/mol] angegeben.

violation-file	overall	bonds	angles	improper	vdw	noe	cdih	tensor
32	335.727	40.2433	100.671	4.95977	27.9154	161.938	0	0
54	335.743	40.3131	100.808	5.05581	27.9305	161.635	0	0
1	335.754	40.2874	100.797	5.07586	27.922	161.672	0	0
88	335.772	40.2584	100.68	4.9988	27.9713	161.863	0	0
39	335.779	40.2742	100.877	5.08022	28.0207	161.527	0	0
87	335.802	40.3384	100.829	4.93115	27.7436	161.96	0	0
80	335.848	40.2286	100.656	5.08376	28.0187	161.861	0	0
91	335.892	40.3595	100.753	5.0633	27.9438	161.773	0	0
12	335.91	40.2136	100.723	4.96317	27.9318	162.079	0	0
66	335.918	40.1803	100.443	4.94658	27.8917	162.456	0	0
59	335.924	40.5428	101.409	5.13464	27.7017	161.136	0	0
33	335.964	40.1703	100.795	4.8297	28.0082	162.161	0	0
42	335.992	40.4917	100.771	4.87258	27.6148	162.242	0	0
35	335.998	40.3363	100.632	5.01992	28.1866	161.823	0	0
56	335.998	40.3782	100.636	4.85112	27.8771	162.256	0	0
67	336.024	40.1663	101.078	5.01423	27.7673	161.998	0	0
63	336.025	40.3565	100.66	5.08051	28.2013	161.727	0	0
30	336.371	40.6138	101.774	5.2081	27.8514	160.924	0	0
8	336.585	40.284	101.815	5.08644	27.9076	161.492	0	0
96	336.681	40.3936	102.112	5.3438	27.8209	161.011	0	0
50	382.852	41.9387	100.911	5.93991	44.2104	189.852	0	0
15	382.871	41.8146	100.865	5.86913	44.295	190.027	0	0
95	382.876	42.0162	100.589	5.85472	44.3187	190.097	0	0
74	382.902	41.8795	100.929	5.98955	44.0797	190.024	0	0
20	382.951	41.7549	100.974	5.9645	44.2591	189.999	0	0
68	383.019	41.8627	101.209	6.00947	44.0295	189.908	0	0
60	392.389	42.4626	105.611	6.54304	40.838	196.934	0	0

25	804.94	54.243	209.894	46.0387	87.163	407.601	0	0
37	804.945	54.1801	210.208	46.3203	87.6642	406.573	0	0
75	804.977	54.2076	210.172	46.4424	87.6425	406.513	0	0
17	805.039	54.2455	210.315	45.8888	87.7785	406.811	0	0
2	1062.94	58.0922	201.027	35.6175	183.219	584.989	0	0
84	1086.3	61.9746	231.85	35.3564	163.935	593.188	0	0
46	1161.85	68.4141	239.331	45.8827	165.933	642.286	0	0
78	1217.36	99.9249	255.949	73.7407	166.819	620.93	0	0
38	1218.09	100.023	259.281	75.529	169.721	613.531	0	0
11	1218.26	99.5844	256.901	72.9239	172.601	616.251	0	0
82	1218.27	99.736	258.442	73.8115	174.024	612.259	0	0
90	1218.56	99.3438	259.822	73.9059	175.424	610.066	0	0
52	1219.51	100.475	262.563	76.3467	172.762	607.358	0	0
79	1222.69	99.3644	262.371	77.3464	176.155	607.453	0	0
9	1255.73	107.313	247.96	75.678	163.935	660.842	0	0
26	1268.89	105.355	257.038	81.9505	163.491	661.05	0	0
77	1507.17	76.4134	302.048	53.8125	228.828	846.071	0	0
73	1525.16	78.8011	377.014	66.6534	214.041	788.648	0	0
21	1525.22	78.7793	376.906	66.5717	213.971	788.991	0	0
86	1525.23	78.8793	377.7	66.6364	214.345	787.668	0	0
3	1525.26	78.6982	377.096	66.7625	213.804	788.895	0	0
41	1525.29	78.7178	377.18	66.4599	213.745	789.183	0	0
57	1525.3	78.8156	377.078	66.85	214.249	788.311	0	0
34	1525.97	78.9319	375.599	67.2823	217.675	786.487	0	0
14	1531.97	68.8588	269.805	74.0749	171.747	947.488	0	0
71	1531.99	68.9217	269.562	73.6483	171.919	947.939	0	0
69	1532.01	68.8061	269.57	74.2122	171.957	947.464	0	0
19	1532.02	68.8912	269.855	74.1868	172.041	947.045	0	0
24	1532.03	69.0373	269.196	73.9825	171.401	948.411	0	0

36	1532.04	68.8133	269.911	74.65	172.227	946.437	0	0
53	1532.04	68.7328	269.708	73.4371	172.086	948.072	0	0
62	1532.04	69.0299	269.267	73.7465	171.59	948.403	0	0
40	1532.06	69.204	269.352	73.6067	171.974	947.923	0	0
45	1532.06	68.943	269.162	73.4063	171.773	948.775	0	0
94	1532.06	68.7515	269.499	73.6085	172.039	948.159	0	0
4	1532.07	68.9579	269.502	73.4026	172.028	948.175	0	0
6	1532.07	69.0272	268.995	74.3646	171.564	948.115	0	0
65	1532.12	69.0736	269.357	73.1893	170.344	950.154	0	0
81	1532.31	69.2258	270.05	74.3318	171.758	946.948	0	0
16	1532.45	69.265	270.078	73.2349	169.442	950.428	0	0
85	1543.23	79.8351	359.916	61.7638	207.305	834.413	0	0
43	1543.27	79.8695	359.769	61.9994	206.999	834.63	0	0
44	1543.31	80.3616	360.123	63.6127	208.789	830.427	0	0
70	1543.33	79.4714	359.865	61.2832	208.211	834.496	0	0
48	1543.35	79.6743	360.051	61.6101	209.304	832.712	0	0
58	1543.35	80.4993	360.62	63.5622	210.159	828.507	0	0
83	1543.37	80.2774	360.075	63.4461	209.18	830.39	0	0
22	1543.38	80.0786	360.798	63.1715	206.961	832.367	0	0
23	1543.38	79.875	360.453	61.7014	208.143	833.213	0	0
93	1543.39	80.2108	360.631	63.7542	209.578	829.219	0	0
13	1543.4	80.3465	361.225	63.2497	207.277	831.299	0	0
28	1543.4	80.3849	361.528	63.2561	208.666	829.567	0	0
51	1543.4	79.2896	359.481	62.301	205.556	836.774	0	0
92	1543.4	79.6615	360.977	62.1582	206.155	834.45	0	0
49	1543.42	80.1384	361.625	62.5651	207.252	831.843	0	0
7	1543.42	80.5248	360.382	63.5036	209.872	829.141	0	0
18	1543.43	79.8972	361.362	62.4019	205.967	833.8	0	0
61	1543.45	80.0054	361.529	62.7271	206.405	832.782	0	0

10	1543.47	80.0092	361.989	62.6128	206.818	832.043	0	0
29	1543.5	80.024	361.107	62.0128	207.128	833.231	0	0
47	1543.5	80.0333	361.712	62.6067	205.995	833.148	0	0
27	1543.54	80.3504	361.025	63.0542	209.437	829.67	0	0
5	1543.54	80.2989	360.062	62.7804	208.939	831.459	0	0
76	1543.55	80.3391	360.014	63.7577	210.926	828.517	0	0
55	1543.56	80.4256	359.342	63.1689	211.298	829.324	0	0
31	1543.59	79.6053	361.003	62.6318	204.846	835.503	0	0
64	1543.73	79.8874	359.682	62.0446	206.34	835.771	0	0
72	1615.25	74.1211	293.61	46.7417	235.57	965.205	0	0
89	1620.85	72.781	310.18	55.2081	243.249	939.429	0	0

Tabelle 16: Energietерme aus dem RUN320. Es wurden alle ROE-Werte und die 16 RDC-Werte bei der Analyse verwendet. Alle Energietерme sind in [kcal/mol] und der RMSD in [Hz] angegeben.

violation-file	overall	bonds	angles	improper	vdw	noe	cdih	tensor	RMSD
5	370.971	44.1349	115.457	8.56093	25.261	162.172	0	15.3857	0.98
91	370.971	44.1292	115.361	8.52945	25.3147	162.271	0	15.3661	0.98
68	370.975	44.1299	115.434	8.53426	25.3412	162.203	0	15.3326	0.98
52	370.995	44.0976	115.306	8.50184	25.3108	162.359	0	15.4193	0.98
38	371.006	44.1321	115.28	8.51184	25.3536	162.326	0	15.403	0.98
56	371.009	44.1788	115.362	8.52993	25.2854	162.255	0	15.3972	0.98
17	371.012	44.1537	115.444	8.58579	25.3796	162.117	0	15.3318	0.98
85	371.012	44.1735	115.328	8.55057	25.3276	162.281	0	15.3516	0.98
1	371.013	44.1236	115.291	8.46796	25.307	162.452	0	15.372	0.98
79	371.018	44.0321	115.458	8.51847	25.2816	162.356	0	15.3725	0.98
51	371.036	44.046	115.42	8.53477	25.363	162.247	0	15.4256	0.98
96	371.042	44.1108	115.314	8.5885	25.3372	162.222	0	15.4689	0.98
63	371.086	43.9651	115.262	8.57749	25.5683	162.255	0	15.4576	0.98
15	371.231	44.1692	115.489	8.62716	25.643	162.009	0	15.2939	0.98
40	371.377	43.8912	115.166	8.4779	25.5604	162.732	0	15.5499	0.99
66	414.716	43.9429	113.971	7.93167	39.7632	195.379	0	13.7279	0.93
32	414.746	43.8942	113.879	7.83236	39.9247	195.161	0	14.0551	0.94
88	414.753	43.9547	114.026	7.9187	39.81	195.119	0	13.9237	0.93
75	414.756	43.9105	114.125	7.92254	39.7274	195.279	0	13.792	0.93
12	414.759	43.8908	113.979	7.87995	39.7908	195.246	0	13.9731	0.93
90	414.807	43.9322	113.917	7.83046	39.9611	195.129	0	14.0368	0.94
74	414.81	43.9628	113.867	7.85654	39.8485	195.232	0	14.0432	0.94
30	414.824	43.7981	113.797	7.71707	40.3587	194.876	0	14.2762	0.94
31	414.848	44.1072	113.741	7.78412	40.1047	195.021	0	14.0899	0.94
20	414.921	43.8073	114.042	7.81818	40.2769	194.624	0	14.353	0.95
95	414.971	43.7548	114.534	7.95007	40.2953	194.061	0	14.3765	0.95
54	416.249	44.1162	115.339	8.06493	40.9718	194.009	0	13.7481	0.93

37	1294.98	70.4591	211.589	36.6307	140.461	804.089	0	31.7485	1.41
7	1296.62	71.854	205.083	42.0405	128.378	813.956	0	35.3077	1.49
67	1296.64	71.9026	202.551	39.8029	128.351	819.449	0	34.5844	1.47
41	1345.36	71.5377	226.745	45.0028	161.876	812.886	0	27.3093	1.31
87	1349.47	109.731	293.298	67.2764	218.368	605.789	0	55.0084	1.85
78	1349.5	109.777	291.535	66.907	217.799	608.512	0	54.971	1.85
26	1349.57	110.234	291.657	66.7679	214.51	610.802	0	55.6031	1.86
80	1349.58	110.209	291.585	66.6783	215.087	610.453	0	55.5727	1.86
39	1349.61	109.478	291.972	67.0251	217.084	608.721	0	55.3294	1.86
44	1349.63	109.731	294.37	67.4334	219.319	604.431	0	54.3453	1.84
9	1349.67	110.14	292.003	66.6085	216.744	609.118	0	55.0523	1.85
77	1349.69	110.003	293.807	67.3632	218.687	605.086	0	54.748	1.85
50	1349.76	110.356	290.771	66.5095	216.081	611.249	0	54.7936	1.85
60	1349.82	110.682	293.611	67.439	218.754	604.84	0	54.4969	1.85
10	1349.96	109.507	292.57	66.6691	214.398	611.037	0	55.7826	1.87
35	1349.96	110.019	291.135	66.3875	217.071	608.973	0	56.3787	1.88
2	1350.16	109.866	294.75	67.9524	219.193	602.567	0	55.8353	1.87
82	1350.28	110.173	295.253	67.5039	214.855	606.677	0	55.8125	1.87
8	1350.48	111.23	292.28	66.9559	217.701	606.469	0	55.8466	1.87
22	1377.06	111.093	275.484	69.9222	239.391	639.891	0	41.2812	1.61
11	1377.11	114.252	272.207	66.2996	214.116	659.649	0	50.584	1.78
59	1380.45	114.332	279.908	69.2624	227.918	643.231	0	45.7991	1.69
72	1570.4	85.8447	344.426	98.7575	212.423	826.504	0	2.44293	0.40
49	1679.22	75.4865	292.976	50.6854	179.792	1048.56	0	31.7181	1.41
24	1682.35	75.1425	280.096	44.3093	176.299	1079.35	0	27.1471	1.30
84	1685.17	79.5247	387.874	73.5962	205.393	863.383	0	75.4025	2.17
70	1685.71	75.7079	277.602	42.9538	173.19	1089.89	0	26.3644	1.28
92	1687.34	76.433	280.795	41.6151	178.457	1085.18	0	24.8655	1.25
86	1688.49	77.9959	282.074	41.5472	177.874	1084.11	0	24.8953	1.25

53	1688.53	77.6266	281.535	42.1884	178.32	1083.72	0	25.138	1.25
19	1688.67	76.9657	279.483	38.9503	181.731	1087.81	0	23.7364	1.22
16	1689.14	75.5091	269.611	42.2963	180.325	1096.57	0	24.8279	1.25
71	1689.78	75.2223	282.297	40.5969	184.395	1084.6	0	22.6715	1.19
14	1690.09	77.3114	282.255	40.4676	180.744	1084.69	0	24.6161	1.24
48	1690.09	78.092	287.816	40.6021	183.842	1075.48	0	24.2595	1.23
13	1697.61	79.7012	292.487	40.9593	187.855	1073.24	0	23.3624	1.21
43	1722.42	67.5633	281.053	48.7776	186.578	1118.58	0	19.8677	1.11
81	1729.81	77.3851	324.765	65.7609	193.165	1061.57	0	7.16406	0.67
62	1758.72	83.5696	300.723	83.6329	230.728	1018.85	0	41.2191	1.61
18	1758.78	84.1246	301.262	85.72	227.901	1017.62	0	42.15	1.62
23	1758.96	83.2024	297.89	83.3625	227.956	1025.07	0	41.4852	1.61
33	1758.96	83.7971	302.794	85.9979	228.553	1015.1	0	42.7151	1.63
21	1759.42	83.4668	306.711	85.2281	234.196	1009.85	0	39.9703	1.58
42	1760.06	82.3809	293.962	82.5139	227.272	1031.7	0	42.2312	1.62
58	1760.48	83.4378	298.326	83.3965	225.983	1026.42	0	42.9131	1.64
93	1761.24	84.6815	297.715	80.2967	228.272	1028.62	0	41.6501	1.61
27	1761.99	83.3616	306.171	81.8108	234.361	1016.79	0	39.4956	1.57
57	1762.65	86.145	301.47	87.2676	221.754	1021.23	0	44.7792	1.67
61	1765.07	84.9707	311.663	84.3488	233.401	1010.83	0	39.8592	1.58
83	1768.08	84.2185	307.899	85.9121	226.141	1020.04	0	43.8742	1.66
89	1769.81	84.8225	316.485	88.091	231.004	1003.83	0	45.5796	1.69
34	1775.68	74.9366	381.867	78.7288	207.032	1027.71	0	5.40455	0.58
3	1776.35	72.9178	386.883	90.3004	220.079	949.868	0	56.2969	1.88
65	1776.63	72.7155	386.41	91.8577	219.825	948.684	0	57.1416	1.89
36	1776.75	72.5357	384.74	91.512	218.858	951.894	0	57.2068	1.89
45	1776.75	72.6655	390.315	92.155	219.09	947.964	0	54.5579	1.85
29	1776.8	72.2589	388.596	90.7873	221.918	947.106	0	56.1331	1.87
76	1777.03	74.4595	378.922	88.6152	218.059	958.22	0	58.7505	1.92

28	1777.38	75.5744	371.296	80.2584	217.323	969.259	0	63.6675	1.99
73	1777.46	72.4413	384.762	92.5318	217.849	950.642	0	59.2307	1.92
47	1777.69	72.0543	389.866	91.0886	220.511	949.37	0	54.7958	1.85
46	1781.78	70.6973	374.883	114.625	153.273	1019.7	0	48.6026	1.74
69	1790.84	69.0653	408.393	148.516	195.37	968.389	0	1.10937	0.26
6	1791.37	70.5061	406.764	145.284	195.143	972.058	0	1.61617	0.32
94	1794.41	67.5551	396.262	144.593	197.31	987.239	0	1.44896	0.30
25	1796.63	66.3445	407.462	148.42	204.169	969.183	0	1.05058	0.26
55	1796.83	67.706	394.46	142.216	206	985.517	0	0.932727	0.24
64	1803.75	67.1728	415.945	155.148	194.103	970.888	0	0.490827	0.18
4	1812.96	66.4399	414.038	146.016	212.927	972.445	0	1.09392	0.26

Tabelle 17: Energietерme aus dem RUN420a. Es wurde der reduzierte ROE-Datensatz bei der Analyse verwendet. Alle Energietерme sind in [kcal/mol] angegeben.

violation-file	overall	bonds	angles	improper	vdw	noe	cdih	tensor
20	49.0476	3.81241	19.567	2.01337	19.6242	4.03065	0	0
8	49.4376	3.42802	19.3399	1.91064	22.7559	2.00316	0	0
65	49.6166	3.45589	19.5992	1.82201	21.3299	3.40957	0	0
95	49.8618	3.18322	18.4058	1.93667	23.4706	2.8655	0	0
33	49.9922	3.64753	20.8403	1.70621	19.7655	4.03261	0	0
82	50.0806	3.38689	20.3191	1.77151	20.5764	4.02661	0	0
3	50.1559	3.24569	18.755	1.86333	21.274	5.01785	0	0
71	50.3084	3.73167	18.5768	1.94325	21.226	4.83069	0	0
38	50.4879	3.33015	21.2476	1.83536	20.381	3.69386	0	0
27	50.5216	3.24513	17.8345	1.83845	23.8454	3.75809	0	0
34	50.7412	3.50739	20.0532	1.88614	22.1003	3.19411	0	0
56	51.4976	3.79677	19.2314	1.88582	21.6249	4.95879	0	0
28	51.5533	3.93914	20.9576	1.73673	21.7197	3.20011	0	0
53	52.2537	3.64097	20.4898	1.90823	23.4498	2.76491	0	0
47	52.2962	3.53651	21.809	1.63691	21.209	4.10482	0	0
35	52.3865	3.78242	20.9231	1.74251	22.6275	3.31094	0	0
37	52.6704	4.36525	20.5321	2.17367	21.6505	3.94881	0	0
66	52.771	3.66308	21.7449	1.70622	20.4897	5.16711	0	0
19	52.8599	3.90563	20.6316	1.67914	23.7054	2.9381	0	0
69	53.1031	4.16358	21.3907	2.00792	22.5305	3.01047	0	0
41	53.1304	4.08991	20.44	1.80892	22.9518	3.83971	0	0
29	53.1516	4.02086	20.3959	1.94269	24.8148	1.97724	0	0
80	53.6652	3.29588	19.6646	1.88163	22.6601	6.163	0	0
87	54.3	3.77209	18.818	1.97059	25.311	4.42832	0	0
79	55.5932	4.40017	20.7837	1.96106	25.541	2.90726	0	0
12	56.0696	3.50897	20.3683	1.88765	25.1683	5.13645	0	0
52	56.1127	3.76297	18.869	2.07565	26.0931	5.31198	0	0

77	56.2729	3.77927	19.9667	1.93183	26.8142	3.78097	0	0
36	56.3839	3.91974	19.7935	2.06501	25.4337	5.17195	0	0
43	56.6487	4.09551	23.2958	1.64064	23.1299	4.48684	0	0
93	57.3523	3.78948	21.5393	2.01063	26.6064	3.40646	0	0
76	58.4548	4.69726	21.2886	1.84732	27.4015	3.22009	0	0
40	58.6242	4.30864	20.4268	2.11881	26.6112	5.15868	0	0
63	58.8812	4.11451	22.9874	2.01413	26.1237	3.64144	0	0
57	59.0693	4.30107	22.8989	2.10028	25.0335	4.73559	0	0
44	60.3955	3.27166	20.5257	1.76999	23.8674	10.9607	0	0
92	60.7714	4.68553	22.733	1.99808	28.7155	2.63921	0	0
31	60.8221	4.1181	23.8782	2.02425	28.1252	2.67637	0	0
45	61.3711	4.10966	22.51	1.89488	27.4464	5.41017	0	0
75	63.0611	5.40175	23.9139	2.15733	29.1084	2.47968	0	0
78	63.0842	4.64676	24.8309	2.05093	28.1063	3.44928	0	0
18	63.7613	4.62879	21.6709	2.07485	31.1811	4.20561	0	0
48	64.2761	5.32339	22.2651	2.16685	27.6233	6.89741	0	0
54	77.3279	5.32921	24.0018	2.47816	33.1011	12.4176	0	0
51	77.6201	4.72419	23.8293	2.20734	30.9426	15.9167	0	0
94	78.6236	5.16971	29.4571	3.88526	34.1282	5.98341	0	0
68	78.7182	5.48001	23.8247	3.00741	33.1623	13.2437	0	0
42	79.15	5.11066	25.2982	2.84251	33.8125	12.0862	0	0
67	80.8349	4.96024	21.9707	2.13274	32.3415	19.4297	0	0
61	84.0347	5.36049	24.0122	2.76254	39.0765	12.8231	0	0
96	84.7929	5.01784	23.3542	2.19873	33.0674	21.1547	0	0
24	86.0437	5.97424	24.958	2.57414	38.0076	14.5297	0	0
21	86.7027	5.06139	28.3018	2.97297	34.8791	15.4875	0	0
5	88.1336	6.74137	27.4002	3.16494	35.5728	15.2543	0	0
30	89.0996	7.20915	28.212	1.99373	39.0342	12.6505	0	0
62	93.458	6.28542	30.3307	2.90445	42.6567	11.2807	0	0

91	95.0797	6.53442	30.9805	2.91237	41.2924	13.36	0	0
49	97.9138	5.31942	30.7066	2.9432	48.8617	10.083	0	0
32	100.207	5.82812	29.7833	2.89079	51.6617	10.0434	0	0
17	100.817	6.26443	29.7436	2.97139	51.9996	9.83785	0	0
39	100.883	5.63492	29.6004	3.08738	50.6687	11.8911	0	0
7	101.643	6.68722	28.6866	2.23912	56.7081	7.32155	0	0
90	101.816	5.38289	30.0012	3.09883	51.4124	11.9207	0	0
72	101.994	6.17693	29.5414	3.37752	51.0479	11.8499	0	0
1	102.415	6.45288	31.1554	3.02343	52.3707	9.41254	0	0
14	102.751	6.65712	31.1769	2.06051	55.7355	7.12109	0	0
50	103.194	6.34107	31.9003	2.16307	55.2003	7.58912	0	0
84	103.229	5.83813	30.9835	2.94393	52.9739	10.4898	0	0
25	104.088	8.31568	27.7308	3.25035	48.7872	16.0036	0	0
16	104.436	7.89015	34.2315	5.81122	41.8471	14.6559	0	0
10	104.888	6.8595	29.6638	2.75715	41.3718	24.2357	0	0
89	105.382	5.8485	32.1941	3.04435	54.5234	9.77147	0	0
64	105.439	6.85816	29.5073	2.91451	53.3087	12.8506	0	0
85	105.707	8.11924	30.485	3.24844	49.3692	14.485	0	0
74	105.987	6.15313	30.5374	3.02313	56.7197	9.55402	0	0
23	106.002	6.41954	30.7858	1.83009	58.729	8.23723	0	0
26	106.312	6.00339	28.6585	3.25802	53.0831	15.3093	0	0
73	106.583	8.30534	33.3007	4.85755	45.2167	14.9025	0	0
88	108.369	6.68914	31.7662	3.11278	56.8941	9.90727	0	0
9	108.5	7.16409	31.9286	2.07417	59.2179	8.11552	0	0
70	108.732	7.82775	30.0179	2.36262	61.8605	6.66299	0	0
11	109.388	6.94335	33.0255	3.26951	56.7829	9.36662	0	0
83	109.686	6.78215	31.0455	3.07189	59.6262	9.16032	0	0
86	109.731	6.59256	31.6459	3.07319	58.1089	10.3104	0	0
60	109.973	6.91544	31.2143	3.07536	55.3395	13.4285	0	0

46	110.483	8.40137	31.8657	2.14757	59.8668	8.20207	0	0
55	110.758	8.55858	31.5413	4.26601	51.0338	15.3581	0	0
2	110.974	7.46578	31.3386	2.50127	62.9243	6.74412	0	0
22	113.3	6.96627	32.116	1.95719	63.7251	8.53538	0	0
4	123.916	6.88574	37.1944	3.39396	67.2824	9.15955	0	0
58	124.028	7.03848	37.0905	3.59119	67.379	8.92856	0	0
13	126.358	7.22084	37.7056	3.48775	69.4765	8.46711	0	0
81	130.858	7.35927	31.7335	3.81616	57.9514	29.9975	0	0
59	133.87	8.07069	34.8758	3.31507	60.5396	27.0684	0	0
6	134.931	8.49577	32.7322	3.00477	71.6214	19.0766	0	0
15	149.974	10.565	40.6838	2.73774	68.5253	27.4619	0	0

Tabelle 18: Energietermine aus der Analyse RUN420b. Bei der Berechnung wurde der reduzierte ROE- und der RDC-Datensatz verwendet. Die generierten Strukturen weisen ein Strukturkontinuum auf und sind nicht mehr geclustert. Der ROE-Anteil an der Gesamtenergie ist deutlich geringer als bei der Verwendung des kompletten ROE-Datensatzes. Alle Energietermine sind in [kcal/mol] und der RMSD in [Hz] angegeben.

violation-file	overall	bonds	angles	improper	vdw	noe	cdih	tensor	RMSD
84	67.6331	3.60286	28.6608	3.0191	20.2155	5.95712	0	6.17772	0.62
31	68.236	4.39375	23.664	3.31475	22.1892	7.1001	0	7.57418	0.69
27	68.646	4.45942	24.0494	3.08413	22.5284	7.13422	0	7.39052	0.68
78	68.657	4.29682	22.2904	3.24684	25.7522	7.26824	0	5.80254	0.60
14	68.7437	4.19768	22.0741	3.00734	26.1688	7.10097	0	6.19474	0.62
67	68.854	4.40284	24.0421	3.05124	22.3994	7.53504	0	7.4234	0.68
24	69.114	4.15227	24.0194	2.92933	22.5269	7.19096	0	8.2952	0.72
51	69.1847	3.31204	28.3334	3.00287	22.2448	6.28785	0	6.00372	0.61
13	69.2066	3.11572	26.7967	3.00769	23.6132	6.98948	0	5.6838	0.60
15	69.2623	4.60317	24.0056	3.14909	22.4842	7.14399	0	7.87621	0.70
38	69.4654	3.73326	27.217	3.30717	22.3243	6.1577	0	6.72595	0.65
56	69.5134	4.7017	23.4799	3.18518	23.6221	7.53956	0	6.98495	0.66
89	69.6376	4.37212	24.7733	3.45518	22.9087	7.0485	0	7.07984	0.67
85	70.0665	4.81001	24.128	3.28136	23.5517	7.57041	0	6.72496	0.65
44	70.2695	4.30706	24.6862	3.14086	23.4115	7.22987	0	7.49397	0.68
5	70.2917	3.69043	28.6574	3.17557	22.2621	5.91425	0	6.59191	0.64
4	71.3549	3.13466	26.8672	2.99938	24.9721	6.9846	0	6.39694	0.63
71	71.3759	4.74918	24.7973	3.36178	24.3782	7.33145	0	6.76E+00	0.65
79	71.4882	4.73678	25.3043	3.17784	23.4737	7.44259	0	7.35296	0.68
41	71.6941	4.71358	25.0352	3.19196	24.2786	7.04861	0	7.42617	0.68
81	71.7711	4.7698	24.5194	3.17509	24.7732	7.5631	0	6.97047	0.66
65	71.8536	5.26571	25.512	3.53808	23.6635	7.4706	0	6.40378	0.63
11	72.1	4.79726	26.6333	3.32153	22.1128	7.15548	0	8.0796	0.71
20	72.3238	4.75259	23.5742	3.13152	27.1741	7.38198	0	6.30944	0.63
96	72.3709	4.76971	26.1424	3.26735	24.0437	7.18231	0	6.96543	0.66
92	72.821	3.78899	28.2961	3.08102	24.9396	6.23302	0	6.48225	0.64

47	72.8389	4.79745	25.618	3.02525	24.3307	7.07286	0	7.99466	0.71
88	72.8684	4.63282	24.6603	3.30499	25.9663	7.49822	0	6.80578	0.65
57	73.0532	4.5058	24.8323	3.03042	25.5614	7.54587	0	7.57742	0.69
16	73.3042	5.0717	24.6877	3.40301	25.6356	7.77703	0	6.72916	0.65
59	73.3196	5.02949	25.0869	2.91073	24.8587	7.66011	0	7.77362	0.70
39	73.4926	4.16558	23.2898	3.07152	29.0397	6.81791	0	7.1081	0.67
26	73.6433	4.07879	28.6892	3.09567	25.4212	6.22057	0	6.13785	0.62
40	73.8165	4.02082	24.2098	2.96284	27.9554	6.7936	0	7.87402	0.70
2	74.1204	4.58887	24.194	3.39639	26.3169	8.18494	0	7.43926	0.68
8	74.1985	3.74913	27.923	3.33399	26.0853	6.6677	0	6.43937	0.63
17	74.3388	4.85643	22.5536	3.15716	30.0934	6.91298	0	6.76524	0.65
94	74.5519	4.89661	25.3295	3.38212	26.6354	7.04354	0	7.26479	0.67
76	74.5947	5.07748	24.8094	3.66212	25.9398	7.29284	0	7.81302	0.70
77	74.8777	3.8701	29.6445	3.16267	25.6635	6.46779	0	6.06909	0.62
23	75.1561	4.23327	28.2457	2.94643	27.2322	6.33547	0	6.163	0.62
62	75.3375	4.91241	25.5188	3.3109	27.3199	7.3119	0	6.9637	0.66
54	75.4366	5.09065	24.5969	3.1369	27.186	7.83013	0	7.59614	0.69
74	75.6981	4.35161	30.7296	3.12245	24.7607	6.70557	0	6.03E+00	0.61
53	77.0296	5.01524	24.8921	3.56096	28.7013	8.03994	0	6.82008	0.65
49	77.6332	4.64619	24.6825	3.19958	31.3476	7.34436	0	6.41298	0.63
22	77.8774	5.07826	26.3988	3.18899	28.6598	7.19077	0	7.3608	0.68
34	79.7	4.94835	22.8022	3.54976	33.9428	7.43789	0	7.01904	0.66
63	83.9873	4.91896	30.933	3.4763	29.0862	8.08494	0	7.48787	0.68
90	87.1627	4.90879	29.6566	3.30961	32.9376	7.76717	0	8.58289	0.73
33	99.9285	6.19053	31.204	3.76965	29.8389	17.1837	0	11.7416	0.86
10	101.287	5.41493	35.2288	4.13988	29.5843	17.3378	0	9.58125	0.77
6	101.776	5.24667	36.3173	4.11085	29.9559	16.7613	0	9.37422	0.77
83	105.172	6.1777	33.3507	4.05457	33.6772	17.6734	0	10.2382	0.80
60	112.384	5.96011	40.34	4.25125	35.5746	16.8032	0	9.45503	0.77

25	112.608	6.64201	38.0711	2.2218	35.3094	14.6437	0	15.7205	0.99
9	122.628	8.59545	42.8333	2.06012	37.9533	13.1501	0	18.0358	1.06
86	159.476	9.3093	47.0636	4.38137	65.8959	27.6601	0	5.16553	0.57
1	159.552	9.13952	49.6361	4.13102	60.5367	30.7646	0	5.3439	0.58
91	160.082	9.13019	51.7896	3.91027	61.6935	29.0624	0	4.49655	0.53
12	164.634	10.3951	53.6933	5.82387	64.7456	25.0572	0	4.91921	0.55
21	166.24	13.0281	53.6174	7.24971	56.8884	32.7641	0	2.69237	0.41
30	175.659	13.2301	57.0739	6.46502	70.7002	27.5223	0	0.66707	0.20
29	179.19	14.2761	59.9263	9.9486	61.3342	28.5292	0	5.17602	0.57
3	185.251	14.066	60.6415	8.91341	77.0798	24.4981	0	0.05168711	0.06
95	198.534	9.97674	63.1547	9.74085	52.137	27.3588	0	36.1657	1.50
45	210.919	16.9668	66.1652	10.714	95.7799	21.2925	0	0.000187403	0.00
61	218.683	16.4312	77.8888	7.61976	99.3872	17.3313	0	0.0251215	0.04
52	222.073	19.0931	73.2514	9.77083	103.9	16.0426	0	0.01472483	0.03
80	222.647	18.2216	73.8112	6.84963	101.93	21.7425	0	0.09222684	0.08
69	231.534	21.4842	74.111	9.42497	108.229	18.2585	0	0.02642191	0.04
43	236.142	12.1709	72.7262	7.94355	72.5675	44.9058	0	25.8276	1.27
48	237.416	12.182	75.9584	8.38725	72.4376	44.9104	0	23.5407	1.21
58	243.331	12.7364	80.45	9.49475	77.9884	42.6678	0	19.9934	1.12
82	247.036	7.46715	60.9213	9.67342	69.1343	19.4165	0	80.4237	2.24
46	250.239	7.50642	58.2704	13.4169	72.4079	20.264	0	78.3733	2.21
93	251.067	13.5404	59.9998	7.73254	79.2166	63.4065	0	27.1711	1.30
73	251.814	8.59777	60.6177	13.117	76.0384	17.8697	0	7.56E+01	2.17
42	252.411	8.13634	63.9684	8.43969	71.8939	18.8939	0	81.0787	2.25
36	253.119	8.0846	62.5849	11.3248	75.3012	17.7304	0	78.0932	2.21
72	253.216	13.6272	59.3102	8.95845	80.0543	58.2	0	3.31E+01	1.44
70	254.442	7.6926	60.2766	12.125	74.5337	20.4859	0	7.93E+01	2.23
55	254.514	8.18294	59.6679	14.4873	76.7043	19.8008	0	75.6705	2.17
50	254.774	8.43642	68.712	6.66753	69.3723	17.6163	0	83.969	2.29

87	255.298	13.1582	60.7695	8.74462	89.2445	44.7624	0	38.6184	1.55
64	256.753	10.6342	81.7622	13.1998	83.404	40.3302	0	27.4231	1.31
68	258.353	9.67829	78.8227	12.9987	90.7258	39.3287	0	26.7985	1.29
66	258.731	11.1925	103.546	9.49189	68.0932	43.4143	0	22.9928	1.24
18	262.627	14.6971	106.82	30.8302	72.8467	36.8499	0	0.583421	0.21
37	264.005	9.47063	65.1421	10.7756	84.1857	18.1826	0	76.2482	2.18
32	264.657	10.1515	89.6726	14.9974	87.5566	40.5979	0	21.6806	1.16
28	265.858	14.1042	59.9787	14.815	76.3518	61.6547	0	38.9533	0.91
7	266.757	10.3513	85.9973	13.5319	92.7707	40.2122	0	23.8932	1.26
35	268.601	17.408	69.4721	9.15363	86.8422	62.1358	0	23.5892	1.21
19	301.047	10.6177	89.953	5.71784	92.4373	34.704	0	67.6172	2.12
75	305.858	13.6072	50.6135	8.95864	61.3457	105.237	0	66.0967	2.03

Tabelle 19: ROE-Verletzungen aus den XPLOR-Violation Files der einzelnen Strukturen der Analyse 420b. Die Abstandsdistancen sind in [Å] der Energiewert in [kcal/mol] angegeben.

violation-file	No	residue	No	residue	R<average>	NOE<measured>	±	Delta	E(NOE)
1	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.697	4.99	0.5	-0.207	2.135
	7	LEU-HN	11	GLY-HN	4.363	3.67	0.37	-0.323	5.221
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.596	3.11	0.31	0.204	2.086
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.667	3.95	0.4	-0.317	5.019
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.449	3.27	0.33	0.491	12.069
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.486	4.79	0.48	-0.216	2.34
10	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.81	5.59	0.56	0.22	2.413
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.926	4.19	0.42	-0.316	4.993
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	4.345	3.76	0.38	-0.205	2.105
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.008	5.79	0.58	0.202	2.034
11	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.709	5.48	0.55	0.221	2.437
12	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.595	3.11	0.31	0.205	2.105
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.663	3.95	0.4	-0.313	4.89
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.45	3.27	0.33	0.49	12.002
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.005	5.79	0.58	0.205	2.098
13	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.493	4.79	0.48	-0.223	2.491
14	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.494	4.79	0.48	-0.224	2.505
15	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.702	5.48	0.55	0.228	2.599
16	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.697	5.48	0.55	0.233	2.706
17	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.49	4.79	0.48	-0.22	2.422
18	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.209	2.68	0.27	-0.259	3.35
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.498	3.11	0.31	0.302	4.549
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.44	3.27	0.33	0.5	12.505
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.591	4.8	0.48	-0.311	4.824
	5	LEU-HA	6	MPR-HD2	2.861	2.39	0.24	-0.231	2.664
19	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.587	3.9	0.39	-0.297	4.398
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.172	4.52	0.45	-0.202	2.033
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.384	3.04	0.3	0.356	6.337
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.914	4.19	0.42	-0.304	4.633
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.563	3.95	0.4	-0.213	2.27
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.589	4.8	0.48	-0.309	4.762
	6	MPR-HD2	7	LEU-HN	4.214	4.98	0.5	0.266	3.527

	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.988	5.79	0.58	0.222	2.457
2	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.692	5.48	0.55	0.238	2.839
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.009	5.79	0.58	0.201	2.026
20	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.497	4.79	0.48	-0.227	2.584
21	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.374	2.68	0.27	-0.424	8.974
	7	LEU-HN	7	LEU-HA	2.389	3.05	0.3	0.361	6.505
	7	LEU-HN	10	LEU-HA	6.511	5.64	0.56	-0.311	4.84
	9	MPR-HD2	10	LEU-HA	6.594	5.78	0.58	-0.234	2.729
22	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.698	5.48	0.55	0.232	2.688
24	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.699	5.48	0.55	0.231	2.662
25	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.518	3.04	0.3	0.222	2.461
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.902	4.19	0.42	-0.292	4.251
27	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.702	5.48	0.55	0.228	2.601
28	7	LEU-HA	11	GLY-HN	4.279	4.99	0.5	0.211	2.235
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.243	2.68	0.27	-0.293	4.279
	5	LEU-HA	7	LEU-HN	4.273	5.13	0.51	0.347	6.007
	6	MPR-HA	7	LEU-HN	3.253	2.65	0.27	-0.333	5.532
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.479	3.04	0.3	0.261	3.416
	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.82	5.59	0.56	0.21	2.214
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.12	4.19	0.42	-0.51	12.983
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.623	3.95	0.4	-0.273	3.731
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.586	3.98	0.4	-0.206	2.117
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.646	4.34	0.43	0.264	3.489
	6	MPR-HD2	7	LEU-HN	4.21	4.98	0.5	0.27	3.654
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.576	4.79	0.48	-0.306	4.693
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.946	5.79	0.58	0.264	3.482
29	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.365	4.52	0.45	-0.395	7.8
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.351	2.68	0.27	-0.401	8.022
	7	LEU-HN	7	LEU-HA	2.488	3.05	0.3	0.262	3.434
3	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.274	2.68	0.27	-0.324	5.237
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.788	3.95	0.4	-0.438	9.571
30	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.231	2.68	0.27	-0.281	3.961
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.842	3.95	0.4	-0.492	12.082
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.678	3.27	0.33	0.262	3.421

	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.962	5.79	0.58	0.248	3.082
31	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.707	5.48	0.55	0.223	2.495
32	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.323	4.52	0.45	-0.353	6.217
	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.784	4.99	0.5	-0.294	4.329
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.014	4.19	0.42	-0.404	8.155
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.725	3.27	0.33	0.215	2.32
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.646	4.8	0.48	-0.366	6.685
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.587	4.79	0.48	-0.317	5.024
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.924	5.79	0.58	0.286	4.091
33	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.814	5.59	0.56	0.216	2.325
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.918	4.19	0.42	-0.308	4.736
	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.726	5.48	0.55	0.204	2.091
34	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.508	4.79	0.48	-0.238	2.828
35	7	LEU-HA	11	GLY-HN	4.224	4.99	0.5	0.266	3.542
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.21	2.68	0.27	-0.26	3.368
	5	LEU-HA	7	LEU-HN	4.316	5.13	0.51	0.304	4.623
	6	MPR-HA	7	LEU-HN	3.281	2.65	0.27	-0.361	6.522
	5	LEU-HN	7	LEU-HN	4.123	4.91	0.49	0.297	4.396
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.042	4.19	0.42	-0.432	9.336
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.652	3.98	0.4	-0.272	3.701
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.553	4.34	0.43	0.357	6.37
	6	MPR-HD2	7	LEU-HN	4.274	4.98	0.5	0.206	2.124
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.627	4.79	0.48	-0.357	6.373
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.931	5.79	0.58	0.279	3.905
36	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.605	3.9	0.39	-0.315	4.973
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.194	4.52	0.45	-0.224	2.505
37	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.62	3.9	0.39	-0.33	5.436
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.18	4.52	0.45	-0.21	2.195
39	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.492	4.79	0.48	-0.222	2.453
4	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.479	4.79	0.48	-0.209	2.187
	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.719	5.48	0.55	0.211	2.224
40	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.485	4.79	0.48	-0.215	2.305
41	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.706	5.48	0.55	0.224	2.508
42	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.629	3.9	0.39	-0.339	5.757

	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.191	4.52	0.45	-0.221	2.434
43	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.569	3.9	0.39	-0.279	3.889
	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.734	5.59	0.56	0.296	4.39
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.966	4.19	0.42	-0.356	6.333
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.591	3.95	0.4	-0.241	2.893
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.699	3.98	0.4	-0.319	5.096
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.458	4.34	0.43	0.452	10.194
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.943	5.79	0.58	0.267	3.578
44	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.702	5.48	0.55	0.228	2.605
45	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.174	2.68	0.27	-0.224	2.518
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.637	3.27	0.33	0.303	4.577
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.677	4.34	0.43	0.233	2.719
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.113	3.76	0.38	0.267	3.56
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.505	4.79	0.48	-0.235	2.759
46	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.662	3.9	0.39	-0.372	6.905
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.583	3.11	0.31	0.217	2.35
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.565	3.95	0.4	-0.215	2.309
47	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.706	5.48	0.55	0.224	2.51
48	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.538	3.9	0.39	-0.248	3.08
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.187	4.52	0.45	-0.217	2.348
	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.72	5.59	0.56	0.31	4.802
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.943	4.19	0.42	-0.333	5.529
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.676	3.98	0.4	-0.296	4.381
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.397	4.34	0.43	0.513	13.148
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.951	5.79	0.58	0.259	3.354
49	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.493	4.79	0.48	-0.223	2.476
50	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.593	3.9	0.39	-0.303	4.581
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.208	4.52	0.45	-0.238	2.826
51	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.001	5.79	0.58	0.209	2.186
52	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.17	2.68	0.27	-0.22	2.409
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.68	3.27	0.33	0.26	3.372
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.114	3.76	0.38	0.266	3.53
53	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.69	5.48	0.55	0.24	2.876
54	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.697	5.48	0.55	0.233	2.714

55	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.648	3.9	0.39	-0.358	6.418
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.575	3.11	0.31	0.225	2.527
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.585	3.98	0.4	-0.205	2.099
56	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.692	5.48	0.55	0.238	2.835
57	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.699	5.48	0.55	0.231	2.674
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.009	5.79	0.58	0.201	2.027
58	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.245	4.52	0.45	-0.275	3.777
	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.702	5.59	0.56	0.328	5.384
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.929	4.19	0.42	-0.319	5.103
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.623	3.98	0.4	-0.243	2.964
	5	LEU-HN	11	GLY-HA2	3.389	4.34	0.43	0.521	13.549
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.957	5.79	0.58	0.253	3.213
59	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.692	5.48	0.55	0.238	2.828
6	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.818	5.59	0.56	0.212	2.253
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.921	4.19	0.42	-0.311	4.826
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	4.344	3.76	0.38	-0.204	2.087
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.005	5.79	0.58	0.205	2.1
60	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.815	5.59	0.56	0.215	2.304
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.922	4.19	0.42	-0.312	4.875
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	4.346	3.76	0.38	-0.206	2.118
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.007	5.79	0.58	0.203	2.071
61	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.65	3.27	0.33	0.29	4.2
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.063	3.76	0.38	0.317	5.018
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.492	4.79	0.48	-0.222	2.455
62	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.7	5.48	0.55	0.23	2.656
63	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.585	3.98	0.4	-0.205	2.094
	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.694	5.48	0.55	0.236	2.789
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.009	5.79	0.58	0.201	2.011
64	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.267	4.52	0.45	-0.297	4.425
	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.733	4.99	0.5	-0.243	2.949
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.161	2.68	0.27	-0.211	2.229
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.037	4.19	0.42	-0.427	9.136
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.65	4.8	0.48	-0.37	6.827
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.581	4.79	0.48	-0.311	4.84

	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.946	5.79	0.58	0.264	3.488
65	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.697	5.48	0.55	0.233	2.71
66	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.3	4.52	0.45	-0.33	5.437
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.178	2.68	0.27	-0.228	2.594
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.405	3.04	0.3	0.335	5.625
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.283	4.19	0.42	-0.673	21.171
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.941	5.79	0.58	0.269	3.608
67	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.695	5.48	0.55	0.235	2.759
68	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.293	4.52	0.45	-0.323	5.203
	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.775	4.99	0.5	-0.285	4.052
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.027	4.19	0.42	-0.417	8.68
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.629	4.8	0.48	-0.349	6.091
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.576	4.79	0.48	-0.306	4.675
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.927	5.79	0.58	0.283	3.996
69	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.158	2.68	0.27	-0.208	2.16
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.634	3.27	0.33	0.306	4.686
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.119	3.76	0.38	0.261	3.415
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.916	5.79	0.58	0.294	4.31
7	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.304	4.52	0.45	-0.334	5.581
	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.805	4.99	0.5	-0.315	4.96
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.994	4.19	0.42	-0.384	7.391
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.69	4.8	0.48	-0.41	8.409
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.569	4.79	0.48	-0.299	4.47
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.939	5.79	0.58	0.271	3.665
70	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.67	3.9	0.39	-0.38	7.221
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.181	4.52	0.45	-0.211	2.231
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.58	3.11	0.31	0.22	2.42
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.562	3.95	0.4	-0.212	2.242
71	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.699	5.48	0.55	0.231	2.675
72	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.383	2.68	0.27	-0.433	9.364
	5	LEU-HA	7	LEU-HN	4.398	5.13	0.51	0.222	2.474
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.372	3.04	0.3	0.368	6.78
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.281	4.19	0.42	-0.671	21.057
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.613	3.95	0.4	-0.263	3.449

	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.623	4.79	0.48	-0.353	6.247
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.988	5.79	0.58	0.222	2.457
73	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.596	3.9	0.39	-0.306	4.685
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.202	4.52	0.45	-0.232	2.693
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.579	3.11	0.31	0.221	2.445
74	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.998	5.79	0.58	0.212	2.245
75	5	LEU-HA	7	LEU-HN	4.303	5.13	0.51	0.317	5.025
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.377	3.04	0.3	0.363	6.579
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.236	4.19	0.42	-0.626	18.8
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	5.495	3.95	0.4	-1.145	44.759
	7	LEU-HN	11	GLY-HA1	4.599	3.98	0.4	-0.219	2.403
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.941	5.79	0.58	0.269	3.614
	8	VAL-HA	9	MPR-HB1	5.61	4.55	0.45	-0.61	17.992
76	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.703	5.48	0.55	0.227	2.568
77	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.999	5.79	0.58	0.211	2.219
78	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.496	4.79	0.48	-0.226	2.565
79	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.702	5.48	0.55	0.228	2.594
8	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	5.005	5.79	0.58	0.205	2.102
80	7	LEU-HA	11	GLY-HN	5.692	4.99	0.5	-0.202	2.04
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.681	3.27	0.33	0.259	3.367
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.038	3.76	0.38	0.342	5.837
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.893	5.79	0.58	0.317	5.009
81	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.692	5.48	0.55	0.238	2.843
82	8	VAL-HA	11	GLY-HN	4.653	3.9	0.39	-0.363	6.597
	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.19	4.52	0.45	-0.22	2.429
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.552	3.95	0.4	-0.202	2.048
83	5	LEU-HN	6	MPR-HA	4.804	5.59	0.56	0.226	2.547
	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.924	4.19	0.42	-0.314	4.925
85	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.695	5.48	0.55	0.235	2.751
86	7	LEU-HN	11	GLY-HN	4.341	3.67	0.37	-0.301	4.537
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.589	3.11	0.31	0.211	2.234
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.648	3.95	0.4	-0.298	4.432
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.456	3.27	0.33	0.484	11.719
87	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.351	2.68	0.27	-0.401	8.043

	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.52	3.04	0.3	0.22	2.428
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.06	4.19	0.42	-0.45	10.108
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.62	3.95	0.4	-0.27	3.637
	5	LEU-HN	11	GLY-HA1	5.641	4.8	0.48	-0.361	6.527
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.589	4.79	0.48	-0.319	5.092
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.926	5.79	0.58	0.284	4.022
88	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.698	5.48	0.55	0.232	2.694
89	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.707	5.48	0.55	0.223	2.495
9	4	THR-HA	5	LEU-HA	4.869	4.19	0.42	-0.259	3.364
	5	LEU-HN	6	MPR-HD2	4.99	5.79	0.58	0.22	2.431
90	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.493	4.79	0.48	-0.223	2.495
91	7	LEU-HN	11	GLY-HN	4.343	3.67	0.37	-0.303	4.578
	4	THR-HA	5	LEU-HN	2.586	3.11	0.31	0.214	2.289
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.643	3.95	0.4	-0.293	4.284
	7	LEU-HN	11	GLY-HA2	2.462	3.27	0.33	0.478	11.427
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.485	4.79	0.48	-0.215	2.322
93	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.363	2.68	0.27	-0.413	8.544
	5	LEU-HA	7	LEU-HN	4.349	5.13	0.51	0.271	3.671
	5	LEU-HN	5	LEU-HA	2.363	3.04	0.3	0.377	7.105
	4	THR-HA	5	LEU-HA	5.284	4.19	0.42	-0.674	21.196
	8	VAL-HA	10	LEU-HA	4.646	3.95	0.4	-0.296	4.39
	6	MPR-HA	11	GLY-HA2	3.135	3.76	0.38	0.245	2.998
	5	LEU-HA	6	MPR-HB1	5.606	4.79	0.48	-0.336	5.654
	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.725	5.48	0.55	0.205	2.097
94	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.703	5.48	0.55	0.227	2.569
95	9	MPR-HA	11	GLY-HN	5.365	4.52	0.45	-0.395	7.792
	10	LEU-HA	11	GLY-HN	3.437	2.68	0.27	-0.487	11.868
	7	LEU-HN	7	LEU-HA	2.464	3.05	0.3	0.286	4.095
96	6	MPR-HB2	7	LEU-HA	4.711	5.48	0.55	0.219	2.402

Tabelle 20: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@*hotFCHT*, bei der Verwendung von 16 RDCs (Rückgrat).

16-RDC-Werte	RMSD [Hz]	Q-Factor	Aa [E-03]	Ar [E-04]	GDO [E-03]
5	1.38	0.186	1.188	3.153	1.219
4	1.32	0.178	1.171	3.127	1.202
27	1.39	0.187	1.366	4.506	1.421
78	1.24	0.167	1.434	5.258	1.504
84	1.37	0.184	1.182	3.133	1.213
31	1.46	0.196	1.372	4.492	1.426
14	1.34	0.181	1.405	5.052	1.472
67	1.44	0.194	1.359	4.61	1.416
24	1.51	0.203	1.344	4.447	1.398
51	1.37	0.184	1.177	3.111	1.208
13	1.24	0.167	1.179	3.288	1.213
15	1.43	0.193	1.368	4.695	1.428
38	1.51	0.203	1.22	3.356	1.254
56	1.38	0.186	1.357	4.618	1.415
89	1.38	0.186	1.368	4.561	1.423
85	1.37	0.184	1.381	4.664	1.439
44	1.48	0.199	1.348	4.477	1.403
71	1.39	0.187	1.395	4.759	1.455
79	1.47	0.198	1.369	4.536	1.424
41	1.45	0.196	1.359	4.589	1.416

Tabelle 21: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@*hotFCHT*, bei der Verwendung von 20 RDCs (Rückgrat und Prolin 5).

20-RDC-Werte	RMSD [Hz]	Q-Factor	Aa [E-03]	Ar [E-04]	GDO[E-03]
5	1.71	0.182	1.181	3.168	1.213
4	4.94	0.526	1.134	3.528	1.174
27	2.54	0.27	1.308	4.372	1.362
78	5.08	0.541	1.367	5.697	1.453
84	1.63	0.173	1.178	3.133	1.209
31	2.63	0.28	1.312	4.361	1.365
14	5.07	0.54	1.342	5.471	1.423
67	2.40	0.256	1.302	4.439	1.357
24	2.44	0.26	1.293	4.322	1.346
51	1.57	0.167	1.174	3.118	1.204
13	4.89	0.521	1.141	3.718	1.186
15	2.53	0.27	1.306	4.525	1.364
38	2.05	0.218	1.209	3.363	1.244
56	2.38	0.254	1.301	4.457	1.357
89	2.49	0.266	1.309	4.415	1.363
85	2.53	0.27	1.317	4.482	1.373
44	2.38	0.254	1.297	4.331	1.35
71	2.62	0.279	1.324	4.554	1.381
79	2.51	0.267	1.308	4.366	1.361
41	2.46	0.266	1.303	4.439	1.358

Tabelle 22: Qualitätsfaktoren und Alignment-Tensorkomponenten der SCST-Berechnungen der 20 energieärmsten Strukturen von RUN420b mit RDC@*hotFCHT*, bei der Verwendung von 23 RDCs (Rückgrat und Prolin 5 und 8).

23-RDC-Werte	RMSD [Hz]	Q-Factor	Aa [E-03]	Ar [E-04]	GDO[E-03]
5	1.88	0.202	1.145	2.794	1.171
4	4.73	0.507	1.09	3.065	1.122
27	2.33	0.25	1.225	3.656	1.265
78	4.91	0.526	1.226	4.495	1.286
84	2.41	0.259	1.163	2.76	1.187
31	2.41	0.258	1.225	3.646	1.265
14	4.88	0.523	1.204	4.322	1.261
67	2.97	0.318	1.258	3.939	1.303
24	2.25	0.242	1.215	3.681	1.256
51	1.89	0.202	1.137	2.749	1.162
13	5.10	0.547	1.117	3.176	1.151
15	3.06	0.328	1.261	4.012	1.308
38	2.16	0.232	1.171	2.96	1.199
56	2.26	0.242	1.221	3.761	1.264
89	2.27	0.243	1.218	3.634	1.258
85	2.31	0.247	1.227	3.704	1.268
44	2.17	0.233	1.214	3.631	1.254
71	2.37	0.255	1.231	3.757	1.273
79	3.01	0.322	1.255	3.824	1.298
41	2.27	0.243	1.214	3.696	1.256

Tabelle 23: Vergleich der TOCSY- Peakintensitäten und $^3J_{HH}$ - Kopplungskonstanten mit Literaturdaten [in der Spalte I-TOCSY-gefordert (UP/ DOWN) und K-gefordert (UP/ DOWN)] aus *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 123-128.²⁰²

Konformer 5- Prolin 5		I = Intensität	K = Kopplungskonstante		
Atom Nr.	Atom Nr.	I-NOESY-expt.	I-TOCSY-expt.	I-TOCSY-gefordert "UP"	I-TOCSY-gefordert "Down"
80 (H α)	83 (H β 2)	schwach (0.06)	mittel/ stark (1.0)	mittel/ stark	schwach
80 (H α)	82 (H β 3)	stark (0.2)	mittel/ stark (1.0)	mittel/ stark	mittel/ stark
82 (H β 3)	85 (H γ 2)	schwach (0.06)	schwach (0.3)	schwach	stark
92 (H δ 3)	85 (H γ 2)	schwach (0.08)	mittel (0.5)	schwach	mittel/ stark
91 (H δ 2)	85 (H γ 2)	stark (0.2)	mittel (0.5)	mittel/ stark	mittel/ stark
Konformer 5- Prolin 8					
Atom Nr.	Atom Nr.	I-NOESY-expt.	I-TOCSY-expt.	I-TOCSY-gefordert "UP"	I-TOCSY-gefordert "Down"
147 (H δ 3)	140 (H γ 2)	mittel (0.15)	mittel (0.46)	schwach	mittel/ stark
146 (H δ 2)	140 (H γ 2)	stark (0.26)	mittel (0.46)	mittel/ stark	mittel/ stark
Konformer 5- Prolin 5					
Atom Nr.	Atom Nr.	K- [Hz] [$^3J_{HH}$]	K-gefordert "UP" [Hz]	K-gefordert "Down" [Hz]	
80 (H α)	83 (H β 2)	nicht sichtbar	7-11	2-3	
80 (H α)	82 (H β 3)	8.1	7-10	6-10	
Konformer 5- Prolin 8					
Atom Nr.	Atom Nr.	K-[Hz] [$^3J_{HH}$]	K-gefordert "UP" [Hz]	K-gefordert "Down" [Hz]	
135 (H α)	138 (H β 2)	2	7-11	2-3	
135 (H α)	137 (H β 3)	8.1	7-10	6-10	

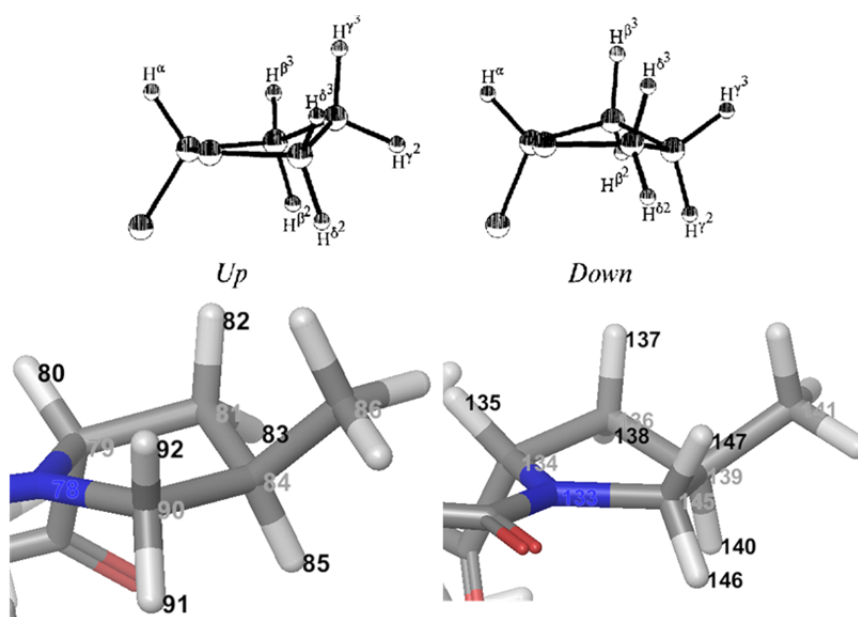


Abbildung 62: Prolin -Ringkonformationen und Atombezeichnungen (bezieht sich auf Tabelle 23). Oberer Abbildung wurde aus *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 123-128²⁰² entnommen. Die Abdruckerlaubnis liegt vor.

6.2. Verweis auf die Daten und Methoden aus dem Hygrophoron-Projekt

Supporting Information

for

RDC-based Determination of the Relative Configuration of the Fungicidal Cyclopentenone 4,6- Diacetylhygrophorone A¹²

Volker Schmidts,[†] Maic Fredersdorf,[†] Tilo Lübken,[‡] Andrea Porzel,[‡] Norbert Arnold,[‡]

Ludger Wessjohann,^{‡} and Christina M. Thiele^{*†}*

[†] Clemens Schöpf Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Technische Universität Darmstadt, Petersenstr. 22, D-64287 Darmstadt, Germany.

[‡] Department of Bioorganic Chemistry, Leibniz Institute of Plant Biochemistry, Weinberg 3, D-06120 Halle/Saale, Germany.

1 / 20

Die kompletten Informationen zu dem Projekt Diacetylhygrophorone A¹² (20 Seiten) finden sie unter dem Link:

http://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/np300728b/suppl_file/np300728b_si_001.pdf

6.3. Verweis auf die Daten und Methoden aus dem Dithienylcyclopenten-Projekt

CHEMISTRY

A European Journal

Supporting Information

Exploring the Conformational Space of Bridge-Substituted Dithienylcyclopentenones

Maic Fredersdorf,^[a, b] Robert Göstl,^[c, d] Andreas Kolmer,^[a] Volker Schmidts,^[a] Peter Monecke,^[b] Stefan Hecht,^{*[c]} and Christina M. Thiele^{*[a]}

chem_201501842_sm_miscellaneous_information.pdf

Die kompletten Informationen zu dem Projekt Dithienylcyclopentenones (60 Seiten) finden sie unter dem Link:

http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/chem.201501842/asset/supinfo/chem_201501842_sm_miscellaneous_information.pdf?v=1&s=7f2ce49d77ed42885c9c5efda03ae66211777701

7. Literatur

- ¹ G. Schultz, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1890**, 23, 1265
- ² F. Strunz, *ChiuZ* **1989**, 23, 170-176, DOI 10.1002/ciuz.19890230505
- ³ D. H. Barton, *Nobel Lecture* **1969**, http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1969/barton-lecture.html
- ⁴ G. H. Christie, J. Kenner, *J. Chem. Soc.* **1922**, 121, 614-620, DOI 10.1039/CT9222100614
- ⁵ W. N. Harworth, *The Constitution of Sugars* **1929**, E. Arnold and Co., London, p. 90
- ⁶ H. A. Staab, *Angew. Chem.* **1958**, 70, 37-64, DOI 10.1002/ange.19580700202
- ⁷ H. Günther, *ChiuZ* **1986**, 20, 173-177, DOI 10.1002/ciuz.19860200602
- ⁸ E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 37, DOI <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.69.37>
- ⁹ F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, 69, 127, DOI <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.69.127>
- ¹⁰ S. Berger, S. Braun, *200 and More NMR Experiments* **2004**, Wiley-VCH, ISBN 3-527-31067-3
- ¹¹ H. Friebolin, *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie* **2006**, Wiley-VCH Verlag, ISBN 3-527-31571-3
- ¹² D. Neuhaus, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis* **2000**, 2nd Edition, Wiley-VCH Verlag, ISBN 978-0-471-24675-6
- ¹³ A. Bax, G. Kontaxis, N. Tjandra, *Methods Enzymol.* **2001**, 339, 127-174, DOI 10.1016/S0076-6879(01)39313-8
- ¹⁴ F. Kramer, M. V. Deshmukh, H. Kessler, S. J. Glaser, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2004**, 21 A, 10-21, DOI 10.1002/cmr.a.20003
- ¹⁵ G. Kummerlöwe, B. Luy, *Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 483-493, DOI 10.1016/j.trac.2008.11.016
- ¹⁶ R. R. Gil, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2-5, DOI 10.1002/ange.201101561
- ¹⁷ A. Saupe, G. Englert, *Physical Review Letters* **1963**, 11, 462-464, DOI 10.1103/PhysRevLett.11.462
- ¹⁸ A. Saupe, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1968**, 7, 97-112, DOI 10.1002/anie.196800971
- ¹⁹ N. Tjandra, A. Bax, *Science* **1997**, 278, 1111-1114, DOI 10.1126/science.278.5340.1111
- ²⁰ J. H. Prestegard, C. M. Bougault, A. I. Kishore, *Chem. Rev.* **2004**, 104, 3519-3540, DOI 10.1021/cr030419i
- ²¹ P. Lesot, M. Sarfarti, J. Courtieu, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1724-1745, DOI 10.1002/chem.200390199
- ²² C. M. Thiele, S. Berger, *Org. Lett.* **2003**, 5, 705-708, DOI 10.1021/ol0275163
- ²³ C. M. Thiele, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2007**, 30 A, 65-80, DOI 10.1002/cmr.a.20075
- ²⁴ C. M. Thiele, *Eur. J. Org. Chem.* **2008**, 5673-5685, DOI 10.1002/ejoc.200800686
- ²⁵ G. Kummerlöwe, B. Crone, M. Kretschmer, S. F. Kirsch, B. Luy, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 2693-2696, DOI 10.1002/ange.201007305
- ²⁶ B. Terlain, J. P. Thomas, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971**, 6, 2363-2365
- ²⁷ A. Kling, P. Lukat, D. V. Almeida, A. Bauer, E. Fontaine, S. Sordello, N. Zaburannyi, J. Herrmann, S. C. Wenzel, C. König, N. C. Ammerman, M. Belén Barrio, K. Borchers, F. Bordon-Pallier, M. Brönstrup, G.

Courtemanche, M. Gerlitz, M. Geslin, P. Hammann, D. W. Heinz, H. Hoffmann, S. Klieber, M. Kohlmann, M. Kurz, C. Lair, H. Matter, E. Nuermberger, S. Tyagi, L. Fraisse, J. H. Grosset, S. Lagrange, R. Müller, *Science* **2015**, 348, 1106-1112, DOI 10.1126/science.aaa4690

²⁸ L. Lannes, *Master-Thesis Université Paul Sabatier Toulouse III* **2011**, Conformational studies of griselimycin derivatives by nuclear magnetic resonance spectroscopy and molecular modelling

²⁹ T. Lübken, J. Schmidt, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, *Phytochemistry* **2004**, 65(8), 1061-1071, DOI 10.1016/j.phytochem.2004.01.023

³⁰ R. Göstl, B. Kobin, L. Grubert, M. Pätzelt, S. Hecht, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 14282-14285, DOI 10.1002/chem.201203111

³¹ M. Irie, *Chemical Reviews* **2000**, 100, 1685–1716, DOI 10.1021/cr980069d

³² W. P. Aue, E. Bartholdi, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1976**, 64, 2229-2246, DOI 10.1063/1.432450

³³ K. Nagayama, A. Kumar, K. Wüthrich, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1980**, 40, 321-334, DOI 10.1016/0022-2364(80)90255-3

³⁴ L. Braunschweiler, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1983**, 53, 521-528, DOI 10.1016/0022-2364(83)90226-3

³⁵ A. Bax, D. G. Davis, *J. Magn. Reson.* **1985**, 63, 207-213, DOI 10.1016/0022-2364(85)90171-4

³⁶ F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik* **2012**, Springer Spektrum, ISBN 978-3-8274-2942-1

³⁷ B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, 118, 282-285, DOI 10.1006/jmra.1996.0038

³⁸ C. M. Thiele, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 889–894, DOI 10.1002/mrc.2055

³⁹ A. Bax, R. Freeman, T. A. Frenkiel, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2102-2104, DOI 10.1021/ja00398a044

⁴⁰ A. Bax, R. H. Griffey, B. L. Hawkins, *J. Magn. Reson.* **1983**, 55, 301-315, DOI 10.1016/0022-2364(83)90241-X

⁴¹ A. Bax, S. Subramanian, *J. Magn. Reson.* **1986**, 67, 565-569, DOI 10.1016/0022-2364(86)90395-1

⁴² L. Müller, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4481-4484, DOI 10.1021/ja00510a007

⁴³ A. Bax, M. F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 2093-2094, DOI 10.1021/ja00268a061

⁴⁴ M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **1959**, 30, 11–15, DOI 10.1063/1.1729860

⁴⁵ M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870-2871, DOI 10.1021/ja00901a059

⁴⁶ M. T. Cung, M. Marraud, J. Neel, *Macromolecules* **1974**, 7, 606–613, DOI 10.1021/ma60041a012

⁴⁷ A. Demarco, M. Llinás, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1978**, 17, 637-650, DOI 10.1002/bip.1978.360170308

⁴⁸ A. Pardi, M. Billeter, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1984**, 180, 741-751, DOI 10.1016/0022-2836(84)90035-4

⁴⁹ B. Reif, M. Hennig, C. Griesinger, *Science* **1997**, 276, 1230-1233, DOI 10.1126/science.276.5316.1230

⁵⁰ B. Reif, H. Steinhagen, B. Junker, M. Reggelin, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1903-1906, DOI 10.1002/(SICI)1521-3773

⁵¹ A. W. Overhauser, *Phys. Rev.* **1953**, 92, 411-415, DOI 10.1103/PhysRev.92.411

⁵² W. A. Anderson, R. Freeman, *J. Chem. Phys.* **1962**, 37, 85-103, DOI 10.1063/1.1732980

⁵³ F. A. L. Anet, A. J. R. Bourn, *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 5250-5251, DOI 10.1021/ja00950a048

-
- ⁵⁴ J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann, R. R. Ernst, *J. Chem. Phys.* **1979**, 71, 4546-4553, DOI 10.1063/1.438208
- ⁵⁵ G. Wagner, K. Wüthrich, *J. Mol. Biol.* **1982**, 155, 347-366, DOI 10.1016/0022-2836(82)90009-2
- ⁵⁶ C. M. Thiele, K. Petzold, J. Schleucher, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 585-588, DOI 10.1002/chem.200802027
- ⁵⁷ S. Macura, B. T. Farmer, L. R. Brown, *J. Magn. Reson.* **1986**, 70, 493-499, DOI 10.1016/00222364(86)90143-5
- ⁵⁸ S. Macura, R. R. Ernst, *Mol. Phys.* **1980**, 41, 95-117, DOI 10.1080/00268978000102601
- ⁵⁹ H. Hu, K. Krishnamurthy, *J. Magn. Reson.* **2006**, 182, 173-177, DOI 10.1016/j.jmr.2006.06.009
- ⁶⁰ K. Stott, J. Stonehouse, J. Keeler, T.-L. Hwang, A. J. Shaka, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 4199-4200, DOI 10.1021/ja00119a048
- ⁶¹ K. Stott, J. Keeler, Q. N. Van, A. J. Shaka, *J. Magn. Reson.* **1997**, 125, 302-324, DOI 10.1006/jmre.1997.1110
- ⁶² C. P. Butts, C. R. Jones, Z. Song, T.J. Simpson, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 9023-9025, DOI 10.1039/c2cc32144k
- ⁶³ C. P. Butts, C. R. Jones, E. C. Towers, J. L. Flynn, L. Appleby, N. J. Barron, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 177-184, DOI 10.1039/c0ob00479k
- ⁶⁴ C. R. Jones, C. P. Butts, J. N. Harvey, *Beistein J. Org. Chem.* **2011**, 7, 145-150, DOI 10.3762/bjoc.7.20
- ⁶⁵ A. Kolmer, L. J. Edwards, I. Kuprov, C. M. Thiele, *J. Magn. Reson.* **2015**, 261, 101-109, DOI 10.1016/j.jmr.2015.10.007
- ⁶⁶ R. Willem, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1987**, 20, 1-94, DOI 10.1016/0079-6565(88)80008-6
- ⁶⁷ K. G. Orrell, V. Sik, D. Stephenson, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1990**, 22, 141-208, DOI 10.1016/0079-6565(90)80004-2
- ⁶⁸ M. H. Levitt, *spin dynamics* **2008**, Wiley-VCH Verlag, ISBN 978-0-470-51118-3
- ⁶⁹ J. W. Hennel, J. Klinowski, *Topics in Current Chemistry* **2005**, 246, 1-14, DOI 10.1007/b98646
- ⁷⁰ H.M Al-Hashimi, H. Valafar, M. Terrell, E.R. Zartler, M.K. Eidsness, J.H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **2000**, 143, 402-406, DOI 10.1006/jmre.2000.2049
- ⁷¹ B. E. Ramirez, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9106-9107, DOI 10.1021/ja982310b
- ⁷² J. A. Losonczy, M. Andrec, M. W. F. Fischer, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **1999**, 138, 334-342, DOI 10.1006/jmre.1999.1754
- ⁷³ G. Cornilescu, J. L. Marquardt, M. Ottiger, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 6836-6837, DOI 10.1021/ja9812610
- ⁷⁴ A. Navarro-Vázquez, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 73-79, DOI 10.1002/mrc.3905
- ⁷⁵ M. Zweckstetter, *Nature Protocols* **2008**, 3, 679-690, DOI 10.1038/nprot.2008.36
- ⁷⁶ F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 277-293, DOI 10.1007/BF00197809
- ⁷⁷ H. Valafar, J. H. Prestegard, *J. Magn. Reson.* **2004**, 167, 228-241, DOI 10.1016/j.jmr.2003.12.012
- ⁷⁸ V. Schmidts, *Diplomarbeit -TU-Darmstadt* **2008**, Kapitel 2.1.4
- ⁷⁹ V. Schmidts, *Dissertation-TU-Darmstadt* **2013**, Kapitel 2.2

- ⁸⁰ E.E. Burnell, C.A. De Lange, *J. Magn. Reson.* **1980**, 39, 461-480, DOI 10.1016/0022-2364(80)90033-5
- ⁸¹ E.E. Burnell, C.A. De Lange, O.G. Mouritsen, *J. Magn. Reson.* **1982**, 50, 188-196, DOI 10.1016/0022-2364(82)90048-8
- ⁸² C. Eckart, *Phys. Rev.* **1935**, 47, 552-558, DOI <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRev.47.552>
- ⁸³ R. M. Dreizler, E. K. U. Gross, *Density Functional Theory* **1990**, Springer-Verlag, ISBN 3-540-51993-9
- ⁸⁴ F. Jensen, *Introduction to Computational Chemistry* **2000**, 2nd Edition, Wiley-VCH Verlag, ISBN 3 527 30620 2
- ⁸⁵ Softwarepaket SYBYL, Version 7.0 und 7.3, Tripos, St. Louis, MO
- ⁸⁶ M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, J. A. M. Jr., T. Vreven, K. N. Kudin, J. C. Burant, J. M. Millam, S. S. Iyengar, J. Tomasi, V. Barone, B. Mennucci, M. Cossi, G. Scalmani, N. Rega, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, M. Klene, X. Li, J. E. Knox, H. P. Hratchian, J. B. Cross, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, P. Y. Ayala, K. Morokuma, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, V. G. Zakrzewski, S. Dapprich, A. D. Daniels, M. C. Strain, O. Farkas, D. K. Malick, A. D. Rabuck, K. Raghavachari, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, Q. Cui, A. G. Baboul, S. Clifford, J. Cioslowski, B. B. Stefanov, G. Liu, A. Liashenko, P. Piskorz, I. Komaromi, R. L. Martin, D. J. Fox, T. Keith, M. A. Al-Laham, C. Y. Peng, A. Nanayakkara, M. Challacombe, P. M. W. Gill, B. Johnson, W. Chen, M. W. Wong, C. Gonzalez, J. A. Pople, Gaussian 03, Revision 6.0, Gaussian Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.
- ⁸⁷ Maestro (Schrödinger), 2012e, v 9.3.5, New York, NY
- ⁸⁸ J.L. Banks, H.S. Beard, Y. Cao, A.E. Cho, W. Damm, R. Farid, A.K. Felts, T.A. Halgren, D.T. Mainz, J.R. Maple, R. Murphy, D.M. Philipp, M.P. Repasky, L.Y. Zhang, B.J. Berne, R.A. Friesner, E. Gallicchio, R.M. Levy, *J. Comp. Chem.* **2005**, 26, 1752-1780, DOI 10.1002/jcc.20292
- ⁸⁹ Gaussian 09, Revision A.01, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, and D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.
- ⁹⁰ Schrödinger, MacroModel 9.7, *Reference Manual* **2009**
- ⁹¹ Schrödinger Seminarunterlagen auf http://sermn.uab.cat/wiki/lib/exe/fetch.php?media=informatica:programari:macromodel:jshelley_mmodconfgen_18sep08.pdf
- ⁹² C. Parish, R. Lombardi, K. Sinclair, E. Smith, A. Goldberg, M. Rappleye, M. Dure, *Journal of Molecular Graphics and Modelling* **2002**, 21, 129-150, DOI 10.1016/S1093-3263(02)00144-4
- ⁹³ C. D. Schwieters, J. J. Kuszewski, N. Tjandra, G. M. Clore, *J. Magn. Reson.* **2003**, 160, 65-73, DOI 10.1016/S1090-7807(02)00014-9
- ⁹⁴ C.D. Schwieters, J.J. Kuszewski, G.M. Clore, *Progr. NMR Spectroscopy* **2006**, 48, 47-62, DOI 10.1016/j.pnmrs.2005.10.001
- ⁹⁵ H.-J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield, S. Grzesiek, *J. Biomol. NMR* **2001**, 21, 275-280, DOI 10.1023/A:1012998006281


-
- ⁹⁶ C. R. Sanders 2nd, J. H. Prestegard, *Biophys. J.* **1990**, 58, 447-460, DOI 10.1016/S0006-3495(90)82390-0
- ⁹⁷ J. Yan, F. Delaglio, A. Kaerner, A. D. Kline, H. Mo, M. J. Shapiro, T. A. Smitka, G. A. Stephenson, E. R. Zartler, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 5008-5017, DOI 10.1021/ja037605q
- ⁹⁸ B. Luy, K. Kobzar, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 1092-1094, DOI 10.1002/anie.200352860
- ⁹⁹ G. Friedel, *Annales de Physique* **1922**, 18, 273-474
- ¹⁰⁰ H. de Vries, *Acta Crystallographica* **1951**, 4, 219-226, DOI 10.1107/S0365110X51000751
- ¹⁰¹ A. Marx, C. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 254-260, DOI 10.1002/chem.200801147
- ¹⁰² A. Marx, B. Böttcher, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 1656-1663, DOI 10.1002/chem.200902287
- ¹⁰³ C. Aroulanda, V. Boucard, F. Guibe, J. Courtieu, D. Merlet, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 4536-4539, DOI 10.1002/chem.200204701
- ¹⁰⁴ P. Lesot, M. Sarfati, J. Courtieu, *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 1724-1745, DOI 10.1002/chem.200390199
- ¹⁰⁵ M. Dama, S. Berger, *Org. Lett.* **2012**, 14, 241-243, DOI 10.1021/ol202547y
- ¹⁰⁶ L. Arnold, A. Marx, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 10342-10346, DOI 10.1002/chem.201000940
- ¹⁰⁷ N. C. Meyer, A. Krupp, V. Schmidts, C. M. Thiele, M. Reggelin, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8459-8463, DOI 10.1002/ange.201201891
- ¹⁰⁸ T. Montag, *Dissertation-TU-Darmstadt* **2013**, Kapitel 2.2. (Tabelle 2-1 und 2.2)
- ¹⁰⁹ K. Czarniecka, E. T. Samulski, *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **1981**, 63, 205-214, DOI 10.1080/00268948108071996
- ¹¹⁰ A. Marx, V. Schmidts, C. M. Thiele, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, 47, 734-740, DOI 10.1002/mrc.2454
- ¹¹¹ R. Berger, J. Courtieu, R. R. Gil, C. Griesinger, M. Köck, P. Lesot, B. Luy, D. Merlet, A. Navarro-Vázquez, M. Reggelin, U. M. Reinscheid, C. M. Thiele, M. Zweckstetter, *Angew. Chem.* **2012**, 124, 8512-8515, DOI 10.1002/ange.201107626
- ¹¹² A. N. Gent, *Macromolecules* **1969**, 2, 262-265, DOI 10.1021/ma60009a010
- ¹¹³ P. W. Kuchel, B. E. Chapman, N. Müller, W. A. Bubb, D. J. Philp, A. M. Torres, *J. Magn. Reson.* **2006**, 180, 256-265, DOI 10.1016/j.jmr.2006.03.002
- ¹¹⁴ G. Kummerlöwe, F. Halbach, B. Laufer, B. Luy, *Open Spectr. J.* **2008**, 2, 29-33, DOI 10.2174/1874383800802010029
- ¹¹⁵ G. Kummerlöwe, E. F. McCord, S. F. Cheatham, S. Niss, R. W. Schnell, B. Luy, *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 7087-7089, DOI 10.1002/chem.201000108
- ¹¹⁶ J. C. Freudenberger, P. Spiteller, R. Bauer, H. Kessler, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 14690-14691, DOI 10.1021/ja046155e
- ¹¹⁷ J. C. Freudenberger, S. Knör, K. Kobzar, D. Heckmann, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 423-426, DOI 10.1002/anie.200461241
- ¹¹⁸ P. Haberz, J. Farjon, C. Griesinger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 427-429, DOI 10.1002/anie.200461267
- ¹¹⁹ G. Kummerlöwe, J. Auernheimer, A. Lendlein, B. Luy, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 6080-6081, DOI 10.1021/ja071248s

-
- ¹²⁰ R. R. Gil, C. Gayathri, N. V. Tsarevsky, K. Matyjaszewski, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 840-848, DOI 10.1021/jo701871g
- ¹²¹ P. Kaden, J. C. Freudenberger, B. Luy, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 22–28, DOI 10.1002/mrc.3887
- ¹²² C. Merle, G. Kummerlöwe, J. C. Freudenberger, F. Halbach, W. Stöwer, C. Lierse v. Gostomski, J. Höpfner, T. Beskers, M. Wilhelm, B. Luy, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 10309–10312, DOI 10.1002/anie.201301929
- ¹²³ T. Montag, C. M. Thiele, *Chem. Eur. J.* **2013**, 19, 2271–2274, DOI 10.1002/chem.201202554
- ¹²⁴ K. Kobzar, H. Kessler, B. Luy, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 3205-3207, DOI 10.1002/ange.200462736
- ¹²⁵ J. C. Rowell, W. D. Phillips, L. R. Melby, M. Panar, *J. Chem. Phys.* **1965**, 43, 3442-3454, DOI 10.1063/1.1696498
- ¹²⁶ P. Trigo-Mouriño, C. Merle, M. R. M. Koos, B. Luy, R. R. Gil, *Chemistry – A European Journal* **2013**, 19, 7013-7019, DOI 10.1002/chem.201300254
- ¹²⁷ A. Enthart, J. C. Freudenberger, J. Furrer, H. Kessler, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2008**, 192, 314–322, DOI 10.1016/j.jmr.2008.03.009
- ¹²⁸ K. Fehér, S. Berger, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 340-346, DOI 10.1016/S1090-7807(03)00113-7
- ¹²⁹ C. M. Thiele, W. Bermel, *J. Magn. Reson.* **2012**, 216, 134-143, DOI 10.1016/j.jmr.2012.01.008
- ¹³⁰ L. Verdier, P. Sakhaei, M. Zweckstetter, C. Chriesinger, *J. Magn. Reson.* **2003**, 163, 353-359, DOI 10.1016/S1090-7807(03)00063-6
- ¹³¹ V. M. Sánchez-Pedregal, R. Santamaría-Fernández, A. Navarro-Vázquez, *Org. Lett.* **2009**, 11, 1471–1474 DOI 10.1021/ol8029565
- ¹³² M. Kurz, P. Schmieder, H. Kessler, *Angewandte Chemie* **1991**, 103, 1341-1342, DOI 10.1002/ange.19911031012
- ¹³³ D. Uhrin, G. Batta, V. J. Hruby, P.N. Barlow, K. E. Kövér, *J. Magn. Reson.* **1998**, 130, 155-161, DOI 10.1006/jmre.1997.1308
- ¹³⁴ R. T. Williamson, B. L. Marquez, W. H. Gerwick, G. E. Martin, V. V. Krishnamurthy, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 127–132, DOI 10.1002/mrc.807
- ¹³⁵ W. Koźmiński, D. Nanz, *J. Magn. Reson.* **1997**, 124, 383–392, DOI 10.1006/jmre.1996.1016
- ¹³⁶ W. Koźmiński, E. Bednarek, W. Bocian, J. Sitkowski, P. E. Hansen, B. Kwiecień, L. Kozerski, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 839–844, DOI 10.1002/1097-458X(200010)38:10<839::AID-MRC745>3.0.CO;2-N
- ¹³⁷ B. L. Marquez, W. H. Gerwick, R. T. Williamson, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 499–530, DOI 10.1002/mrc.902
- ¹³⁸ A. Meissner, O. W. Sorensen, *Magn. Reson. Chem.* **2001**, 39, 49-52, DOI 10.1002/1097-458X(200101)39:1<49::AID-MRC798>3.0.CO;2-S
- ¹³⁹ A. Thogersen, O. W. Sorensen, *J. Magn. Reson. A.* **1994**, 110, 118-120, DOI 10.1006/jmra.1994.1193
- ¹⁴⁰ C. Griesinger, O. W. Sorensen, R. R. Ernst, *J. Magn. Reson.* **1987**, 75, 474-492, DOI 10.1016/0022-2364(87)90102-8
- ¹⁴¹ B. Reif, M. Köck, R. Kerssebaum, H. Kang, W. Fenical, C. Griesinger, *J. Magn. Reson. Ser. A* **1996**, 118, 282–285, DOI 10.1006/jmra.1996.0038
- ¹⁴² C. M. Thiele, W. Bermel, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 889-894, DOI 10.1002/mrc.2055

-
- ¹⁴³ T. Parella, J. F. Espinosa, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2013**, 73, 17–55, DOI 10.1016/j.pnmrs.2013.07.001
- ¹⁴⁴ P. Nolis, J. F. Espinosa, T. Parella, *J. Magn. Reson.* **2006**, 180, 39-50, DOI 10.1016/j.jmr.2006.01.003
- ¹⁴⁵ J. Furrer, M. John, H. Kessler, B. Luy, *J. Biomol. NMR* **2007**, 37, 231-243, DOI 10.1007/s10858-006-9130-x
- ¹⁴⁶ K. E. Kövér, K. Fehér, *J. Magn. Reson.* **2004**, 168, 307-313, DOI 10.1016/j.jmr.2004.03.007
- ¹⁴⁷ T. Schulte-Herbruggen, A. Meissner, A. Papanikos, M. Meldal, O. W. Sorensen, *J. Magn. Reson.* **2002**, 156, 282-294, DOI 10.1006/jmre.2002.2565
- ¹⁴⁸ K. Furihata, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 6271-6275, DOI 10.1016/S0040-4039(99)01233-2
- ¹⁴⁹ J. J. Titman, D. Neuhaus, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **1989**, 85, 111-131, DOI 10.1016/0022-2364(89)90324-7
- ¹⁵⁰ S. Sheng, H. van Halbeek, *J. Magn. Reson.* **1998**, 130, 296-299, DOI 10.1006/jmre.1997.1318
- ¹⁵¹ R. A. E. Edden, J. Keeler, *J. Magn. Reson.* **2004**, 166, 53-68, DOI 10.1016/j.jmr.2003.09.011
- ¹⁵² K. Kobzar, B. Luy, *J. Magn. Reson.* **2007**, 186, 131-141, DOI 10.1016/j.jmr.2007.02.005
- ¹⁵³ J. Saurí, P. Nolis, L. Castañar, A. Virgili, T. Parella, *J. Magn. Reson.* **2012**, 224, 101-106, DOI 10.1016/j.jmr.2012.09.007
- ¹⁵⁴ R. T. Williamson, B. Márquez, W. Gerwick, K. E. Kövér, *Magn. Reson. Chem.* **2000**, 38, 265-273, DOI 10.1002/(SICI)1097-458X(200004)38:4<265::AID-MRC637>3.0.CO;2-#
- ¹⁵⁵ K. E. Kövér, G. Batta, K. Fehér, *J. Magn. Reson.* **2006**, 181, 89-97, DOI 10.1016/j.jmr.2006.03.015
- ¹⁵⁶ S. Gil, J. F. Espinosa, T. Parella, *J. Magn. Reson.* **2010**, 207, 312-321, DOI 10.1016/j.jmr.2010.09.017
- ¹⁵⁷ J. Saurí, T. Parella, J. F. Espinosa, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 4473-4478, DOI 10.1039/c3ob40675j
- ¹⁵⁸ J. Saurí, J. F. Espinosa, T. Parella, *Angew. Chemie* **2012**, 51, 3919-3922, DOI 10.1002/anie.201108959
- ¹⁵⁹ J. Saurí, T. Parella, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 717-721, DOI 10.1002/mrc.3867
- ¹⁶⁰ K. E. Kövér, P. Forgó, *J. Magn. Reson.* **2004**, 166, 47-52, DOI 10.1016/j.jmr.2003.09.015
- ¹⁶¹ L. Jin, D. Uhrin, *Magn. Reson. Chem.* **2007**, 45, 628-633, DOI 10.1002/mrc.2031
- ¹⁶² B. Luy, J. J. Barchi, J. P. Marino, *J. Magn. Reson.* **2001**, 152, 179-184, DOI 10.1006/jmre.2001.2386
- ¹⁶³ B. Böttcher, *Dissertation-TU-Darmstadt* **2011**, Kapitel 2.3.3
- ¹⁶⁴ U. Dettmer, M. Folkerts, E. Kächler, A. Sönnichsen, *Intensivkurs Biochemie* **2005**, Urban & Fischer Verlag, ISBN 3-437-41099-7, S. 153
- ¹⁶⁵ K.-C. Chou, *Analytical Biochemistry* **2000**, 286, 1-16, DOI 10.1006/abio.2000.4757
- ¹⁶⁶ G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, 7, 95–99, DOI 10.1016/S0022-2836(63)80023-6
- ¹⁶⁷ J. Chatterjee, F. Rechenmacher, H. Kessler, *Angew. Chem.* **2013**, 125, 268-283, DOI 10.1002/ange.201205674
- ¹⁶⁸ H. Kessler, M. Köck, T. Wein, M. Gehrke, *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 1818 – 1832, DOI 10.1002/hlca.19900730703
- ¹⁶⁹ J. Klages, C. Neubauer, M. Coles, H. Kessler, B. Luy, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1672-1678, DOI 10.1002/cbic.200500146

-
- ¹⁷⁰ N. Tjandra, J. G. Omichinski, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, A. Bax, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, 4, 732-738, DOI 10.1038/nsb0997-732
- ¹⁷¹ E. Rössner, A. Zeeck, W. A. König, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1990**, 29, 64-65, DOI 10.1002/anie.199000641
- ¹⁷² U. M. Reinscheid, J. Farjon, M. Radzom, P. Haberz, A. Zeeck, M. Blackledge, C. Griesinger, *ChemBioChem* **2006**, 7, 287-296, DOI 10.1002/cbic.200500277
- ¹⁷³ K. Huben, M. Jewgiński, A. Pabis, P. Paluch, B. Luy, S. Jankowski, *J. Pept. Sci.* **2014**, 20, 901-907, DOI 10.1002/psc.2683
- ¹⁷⁴ A. I. Brewster, F. A. Bovey, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1971**, 6, 1199-1202, DOI 10.1073/pnas.68.6.1199
- ¹⁷⁵ H. M. Ge, H. Sun, N. Jiang, Y. H. Qin, H. Dou, T. Yan, Y. Y. Hou, C. Griesinger, R. X. Tan, *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 5213 – 5221, DOI 10.1002/chem.201104078
- ¹⁷⁶ I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 4092-4096, DOI 10.1021/ja00011a006
- ¹⁷⁷ A. Mangoni, V. Esposito, A. Randazzo, *Chem. Commun.* **2003**, 154-155, DOI 10.1039/b210454g
- ¹⁷⁸ C. M. Thiele, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 7403-7413, DOI 10.1021/jo049867w
- ¹⁷⁹ R. M. Gschwind, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 4744-4746, DOI 10.1002/ange.200500634
- ¹⁸⁰ C. M. Thiele, A. Marx, R. Berger, J. Fischer, M. Biel, A. Giannis, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 4566-4571, DOI 10.1002/ange.200503247
- ¹⁸¹ A. Schuetz, J. Junker, A. Leonov, O. F. Lange, T. F. Molinski, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15114-15115, DOI 10.1021/ja075876l
- ¹⁸² G. Kummerlöwe, S. Knör, A. O. Frank, T. Paululat, H. Kessler, B. Luy, *Chem. Comm.* **2008**, 5722-5724, DOI 10.1039/B812905C
- ¹⁸³ A. Schuetz, T. Murakami, N. Takada, J. Junker, M. Hashimoto, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 2062-2064, DOI 10.1002/ange.200705037
- ¹⁸⁴ C. Farès, J. Hassfeld, D. Menche, T. Carlomagno, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 3722-3726, DOI 10.1002/anie.200800225
- ¹⁸⁵ M. E. García, S. Pagola, A. Navarro-Vázquez, D. D. Phillips, C. Gayathri, H. Krakauer, P. W. Stephens, V. E. Nicotra, R. R. Gil, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5670-5674, DOI 10.1002/anie.200900760
- ¹⁸⁶ U. M. Reinscheid, M. Köck, C. Cychon, V. Schmidts, C. M. Thiele, C. Griesinger, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 6900-6903, DOI 10.1002/ejoc.201001392
- ¹⁸⁷ J. D. Swarbrick, T. D. Ashton, *Chirality* **2010**, 22, 42-49, DOI 10.1002/chir.20703
- ¹⁸⁸ M. Schmidt, H. Sun, P. Rogné, G. K. E. Scriba, C. Griesinger, L. T. Kuhn, U. M. Reinscheid, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 3080-3083, DOI 10.1021/ja209050k
- ¹⁸⁹ P. Tzvetkova, B. Luy, S. Simova, *Magn. Reson. Chem.* **2012**, 50, 92-101, DOI 10.1002/mrc.3902
- ¹⁹⁰ V. M. R. Kakita, K. Rachineni, J. Bharatam, *J. Mol. Struct.* **2013**, 1053, 122-126, DOI 10.1016/j.molstruc.2013.08.061
- ¹⁹¹ N. Cramer, S. Helbig, A. Baro, S. Laschat, R. Diestel, F. Sasse, D. Mathieu, C. Richter, G. Kummerlöwe, B. Luy, H. Schwalbe, *ChemBioChem* **2008**, 9, 2474-2486, DOI 10.1002/cbic.200800284
- ¹⁹² C. M. Thiele, V. Schmidts, B. Böttcher, I. Louzao, R. Berger, A. Maliniak, B. Stevansson, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 6708-6712, DOI 10.1002/anie.200902398

-
- ¹⁹³ B. Böttcher, V. Schmidts, J. A. Raskatov, C. M. Thiele, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 210–214, DOI 10.1002/ange.200903649
- ¹⁹⁴ C. Pérez-Balado, H. Sun, C. Griesinger, Á. R. de Lera, A. Navarro-Vázquez, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 11983–11986, DOI 10.1002/chem.201101385
- ¹⁹⁵ H. Sun, U. M. Reinscheid, E. L. Whitson, E. J. d’Auvergne, C. M. Ireland, A. Navarro-Vázquez, C. Griesinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 14629–14636, DOI 10.1021/ja205295q
- ¹⁹⁶ L. Vrzal, K. Flidrová, T. Tobrman, H. Dvořáková, Pavel Lhoták, *Chem. Commun.* **2014**, 50, 7590–7592, DOI 10.1039/c4cc02274b
- ¹⁹⁷ B. Terlain, J. P. Thomas, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1971b**, 6, 2357–2362
- ¹⁹⁸ B. Terlain, J. P. Thomas, *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser. C* **1969**, 269, 1546–1549
- ¹⁹⁹ M. T. Cung, B. Vitoux, P. Demange, M. Marraud, *Mol. Conform. Biol. Interact.* **1991**, 611–625
- ²⁰⁰ Yu. E. Moskalenko, V. Bagutski, C. M. Thiele, manuscript in preparation
- ²⁰¹ In der F2-Dimension wird durch die Aufnahme von 4096 Datenpunkten und einer gewählten Spektralbreite von 7002,8 Hz (10 ppm) eine FID-(Free Induction Decay) Auflösung von 3.42 Hz erreicht. In der F1-Dimension wird durch die Aufnahme von 1024 Inkrementen und einer gewählten Spektralbreite von 31694 Hz (180 ppm) eine Auflösung von 61.9 Hz erreicht. Die isotrope Probe wird mit 16 Scans pro Inkrement, die anisotrope Probe mit 128 Scans pro Inkrement gemessen. Um die digitale Auflösung zur Bestimmung der T- und J- Kopplungen zu verbessern, werden bei der Prozessierung der Daten die extrahierten 1D-Spuren einer inversen- Fourier-Transformation mit einem zero- filling von 131072 Datenpunkten und einer Multiplikation mit einer Exponentialfunktion unterzogen. Anschließend erfolgt erneut eine Fourier Transformation. Dadurch wird eine Auflösung von 0,11 Hz in der F2-Dimension erreicht.
- ²⁰² M. Cai, Y. Huang, J. Liu, R. Krishnamoorthi, *J. Biomol. NMR* **1995**, 6, 123–128, DOI 10.1007/BF00211775
- ²⁰³ G. A. Kaminski, R. A. Friesner, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen, *J. Phys. Chem.* **2001**, 105, 6474–6487, DOI 10.1021/jp003919d
- ²⁰⁴ W. L. Jorgensen, D. S. Maxwell, J. Tirado-Rives, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 11225–11236, DOI 10.1021/ja9621760
- ²⁰⁵ M. Sato, J. Y.H. Lee, H. Nakanishi, M. E. Johnson, R. A. Chrusciel, M. Kahn, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1992**, 187 (2), 999–1006, DOI 10.1016/0006-291X(92)91296-3
- ²⁰⁶ M. A. Baute, G. Deffieux, R. Baute, A. Badoc, J. Vercauteren, J. M. Léger, A. Neveu, *Phytochemistry* **1991**, 30, 1419–1423, DOI 10.1016/0031-9422(91)84177-T
- ²⁰⁷ K. Umino, N. Takeda, Y. Ito, T. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, 22, 1233–1238, DOI 10.1248/cpb.22.1233
- ²⁰⁸ T. Lübken, J. Schmidt, A. Porzel, N. Arnold, L. Wessjohann, *Phytochemistry* **2004**, 65, 1061–1071, DOI 10.1016/j.phytochem.2004.01.023
- ²⁰⁹ E. Orgiu, N. Crivillers, M. Herder, L. Grubert, M. Pätzelt, J. Frisch, E. Pavlica, D. T. Duong, G. Bratina, A. Salleo, N. Koch, S. Hecht, P. Samori, *Nature Chemistry* **2012**, VOL 4, 675–679, DOI 10.1038/nchem.1384




Maic Fredersdorf
Erbacher Strass 59
64287 Darmstadt

29. Februar 2016

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Unterschrift



Maic Fredersdorf
Erbacher Strass 59
64287 Darmstadt

29. Februar 2016

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Unterschrift

Maic Fredersdorf
Erbacher Strasse 59
64287 Darmstadt (Germany)

E-mail maic.fredersdorf@sanofi.com
Geburtstag 24/07/1974
Nationalität deutsch

Ausbildung

07/2011 – 04/2016 **TU-Darmstadt**, Darmstadt
 Dissertation bei Prof. C. M. Thiele
09/2008 – 09/2010 **Universität Leipzig**
 Postgraduales Studium “Spektroskopie und Analytik”
09/1995 – 04/2001 **Fachhochschule Darmstadt**
 Chemieingenieurwesen und Biotechnologie (Dipl.-Ing. (FH))
07/1994 – 07/1995 **Grundwehrdienst, Bruchsal**
 4.\ ABC-Abwehrbataillon 750
09/1987 – 05/1994 **Gymnasium Michelstadt**, Allgemeine Hochschulreife

Berufserfahrung

06/2004 – heute **Sanofi**, Frankfurt
 Abteilung: R&D, Chemistry, *Laborleiter*
12/2001 – 06/2004 **Aventis**, Frankfurt
 Abteilung: Drug Innovation and Approval, Chemistry, *Projektingenieur*
01/1998 – 06/2000 **IBM**, Mainz
 Abteilung: Waferfertigung, Analytik, *Labormitarbeiter*
07/1995 – 01/1998 **Pirelli**, Breuberg
 Abteilung: Vulkanisation und Reifenbau, *Arbeiter*

Zusatzqualifikation

PM Zertifizierter Projektmanager nach IPMA, Level D, (Lizenz 121257)

Darmstadt, 29.02.2016
